

大气压电离液质联机的应用

杨树民

(国家体委运动医学研究所 北京 100029)

[摘要]本文以我们几年来的实际工作为素材,对电喷雾(ESI)和大气压化学电离(APCI)这一近年发展起来的软电离质谱接口技术做了应用性介绍。文中列举了该技术用于药物代谢、蛋白质构象以及热不稳定化合物分析的几个实例,对一些典型化合物在离子源内经碰撞诱导解离(CID)形成的质谱开裂产物进行了解析,对流量匹配、脱溶剂的技术特点、离子在溶液中的预形成、溶剂的选择、仪器的噪声等实践中遇到的问题做了较为详细的讨论。

关键词:大气压电离 电喷雾 大气压化学电离 液质联机

1 引言

大气压电离液相色谱/质谱(ESI-LC/MS, APCI-LC/MS)是近十几年以来得到快速发展的一种软电离方式液相色谱/质谱联用技术。电喷雾(ESI)和大气压化学电离(APCI)接口是这一技术发展的核心。虽然目前的ESI和APCI接口已可与磁质谱乃至飞行时间质谱相联接,但最为成熟的仍是与四极质谱仪的联机。

作为液质联机的接口技术ESI和APCI的发展经历了一个由小流量到大流量匹配,由直接导入使用到与液相色谱联机使用的完善过程。目前,各种商品仪器已实现了与液相色谱和毛细电泳仪的在线联机使用,化学工作站的设计也基本上满足了实验室的需要。

作为液质联机的关键部件,ESI和APCI接口的设计虽各有不同的特色,但均采用了衬套式(sheath)喷雾、惰性辅助气体(drying gas或curtain gas及auxiliary gas)和毛细管入口与喷雾头之间的高电压设置(V_{cap} , 2.5~6.0kV)三项基本技术以保证高效率的离子化。

衬套式喷雾头由内外同轴两管组成,内管传输溶液,外管通以一定压力的惰性气体(N_2),这种设计可以有效地对溶液进行雾化。

惰性气体的使用主要有两种设计方式,即与喷雾相反方向做环状喷射(如HP 59987A)和以一定角度与样品做同方向喷入(如Finnigan TSQ7000ESI System)。同时又有对惰性气体加热(如HP59987A, 0~400℃温度设置)和不加热(Finnigan TSQ7000 ESI System)之分。早期的电喷雾接口没有采用辅助气体,溶剂的脱去主要靠在喷雾盒内的自然挥发及源内一定程度的真空,因此溶剂流量的增加受到了一定的限制,最高流量仅可达每分钟几微升。这种接口可采用柱后分流技术或使用微径液相色谱柱(内径0.10.3mm)实现与液相色谱的联用,但前者会降低样品利用率,而微径柱的使用则要求样品非常干净。辅助气体的使用使得接口进入了离子喷雾(ion spray)阶段,大大地增加了液相色谱与ESI质谱的匹配流量,目前的ESI/APCI接口最高可用到1~2mL/min的流量。

经喷雾头进入离子化室的溶液在一定流速和几何形状的喷雾气体作用下形成直径为 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 的液滴 (droplet), 由于设置在喷雾头上的电场的作用, 液滴进一步地被分散成更小的液滴并由高电场提供给液滴电荷, 形成带电液滴。如果分析物分子是在溶液中就已经形成成为离子 (溶液中加入挥发性的有机酸、碱或基于有机溶剂的质子自递作用), 最初形成的液滴则可能在一开始就带有静电荷。

对于电喷雾的整体过程而言, 带电液滴的形成是整个电喷雾过程的第一步, 而接下来的离子化是成功的进行电喷雾分析的关键。离子化通常可引用以下机制来加以描述: 达到 Rayleigh 极限 (Rayleigh limit) 时的液滴裂变 (fission), 离子蒸发 (ion evaporation) 及带电残渣模型 (charged residue model)。

Rayleigh 极限时的裂变: 直径为 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ 的带电液滴在辅助气体的吹扫下脱去溶剂迅速变小, 随着溶剂的继续脱去及液滴中的电荷丢失, 液滴会形成一个突出 (protrusion) 部分并经由此处裂变成更小的带电液滴。大于 $1 \mu\text{m}$ 的液滴其裂变以不对称方式且在尚未达到真正的 Rayleigh 极限即可能出现。一般认为, 初始的液滴将经历几次这样的裂变过程, 产生越来越小的带电液滴, 直至液滴表面电场强到足以进行离子发射为止。根据对电喷雾产生残渣颗粒的分析, “第二代”液滴的直径将小于 $0.1 \mu\text{m}$ ^[1]。

离子蒸发: 离子蒸发机制是 1976 年首次提出的^[2]。该机制认为随着带电液滴的溶剂在空气中的蒸发, 处于液滴表面的离子可以在一个对动力学或能量而言的临界点上由液相直接被发射进入气相。这一机制可以概括整个离子化的进程, 即当液滴中同时含正离子和负离子时, 总有一种离子为主, 或正或负。如正负离子在数量上并不相等, 会有过剩电荷存在, 这些过剩电荷分布于液滴表面。随着溶剂的继续蒸发, 液滴直径变小而表面电荷密度增加, 达到上述临界点时, 离子被发射进入气相, 完成离子化过程。尽管对离子蒸发理论曾有许多争议, 但它仍不失为一种简单明了的阐述。

实践证明由上述离子化过程所形成的产物仍不是真正的分子离子, 而是带有若干个水分子或溶剂分子的水合离子或溶剂化离子, 被称为“簇” (cluster), 或与其他一些气相中的产物一起被统称为非共价键结合产物, “簇”中所含的水分子或溶剂分子在进入质量分析器 (四级杆) 前大部分被辅助气流或以一定的真空所“剥离”, 此时检测器检出的便是 $M + 1$ 或 $M - 1$ 峰。偶尔出现的 $M + 1 +$ 溶剂分子峰可能是离子源和辅助气温度较低的缘故。

对大分子化合物离子化过程的研究形成了描述大分子离子化的带电残渣模型 (charged residue model) 理论^[3]。该理论认为大分子气相离子的形成是基于溶剂蒸发, 由库仑爆裂 (coulombic explosion) 辅助及较小液滴的相互排斥下导致液滴形成尺寸为 nm 级仅含有一个分子离子的气相离子。

假定初始形成的 μm 级液滴含有多个 P^+ 离子, 则由于 Rayleigh 不稳定性 (Rayleigh instability) 会形成 nm 级 (约 10nm) 的含有一个 P^+ 离子和多个反离子的小液滴, 随着溶剂的高度脱去, 液滴进一步地变小最终形成约 1nm 的分子离子。这些细小的和更为细小的液滴的形成对于分子离子的最终形成都是必要的过程, 用于电喷雾离子化的解释是贴切的。

如果带电残渣模型是真实可信的, 则在较温和的接口条件下会观察到大分子离子中含有某些残渣颗粒, 但随着接口条件变得更加严酷, 这些残渣颗粒会逐渐消失。事实上, 带电残渣理论仅仅与小到中等大小的蛋白分子 ESI 的实验结果相吻合, 并且仅为定性意义上的或趋势上的吻合。

对大分子的电喷雾行为的观察研究还导致了这样的结论, 即电喷雾过程自身对大分

子(蛋白和某些聚合物)电荷状态,乃至它们的聚合程度都有很重要的影响,这可以由电喷雾离子的电荷状态(最高电荷数)与蛋白分子的可质子化程度之间的差异来表明^[4]。因此,在使用 ESI 进行蛋白的分子量测定和构象观察时,要对电喷雾自身在其中的作用及可能由此引入的误差给予充分的考虑。

电喷雾过程自身对化合物分子电荷状态的影响也可以在小分子的离子化(电荷状态)中得到体现。在许多情况下,小分子在某些完全没有质子自递作用的溶剂中是不可能离子的预形成的,但它们在电喷雾过程中出现了很强的 $M + 1$ 分子离子信号,如前所述,可能是高电场提供了必须的电荷。由此可见电喷雾远不是一个如离子蒸发机制所描述的离子由液相向气相的简单转移过程。目前已完成的电喷雾离子化机制的研究为这项新技术提供了理论上的依据,同时也指出了它的广泛应用前景。

随着各种商品仪器的出现,ESI 和 APCI 的应用研究也有了很快的发展。生物大分子分子量的测定,蛋白酶解产物的测定,蛋白表面电荷与其构象关系的研究^[5]等有关生物大分子的研究都有许多报道。小分子的测定应用也引起了人们普遍的兴趣。由目前大量的研究结果看,有机酸碱,芳香族化合物,杂环化合物,甾体等常见化合物或药物都可用 ESI 或 APCI,以正离子或负离子模式获得很好的信号^[6,7],这表明以 API 为接口的 LC/MS 确有着比 GC/MS 更广泛的应用范围。

作为软电离接口,ESI 接口不具备很强的使化合物开裂的能力。离子源内离子传输区的碰撞诱导解离(collision-induced degradation, CID)电压设置作为得到碎片的手段,仅对某些不稳定结构有效,对某些结构稳定的化合物,如大部分的甾体化合物,不能产生显著量的碎片,这显然对化合物结构信息的获得有一定的制约。与 ESI 相比,APCI 接口则在此方面有一定的优势。

APCI 接口采用了电晕(corona)放电技术作为化学电离的手段,以电晕针产生的电子轰击空气中主要组份 N_2 , O_2 , H_2O , 得到初级离子(primary ion) M_2^+ , O_2^+ , H_2O^+ , 再由这些初级离子与被分析物分子进行电子或质子交换产生出被分析物的分子离子。这样一种电离过程可使某些化合物碎片有显著增加。以睾酮为例,由于其稳定的结构,用 ESI 接口得到的质谱仅有 $M + 1$ 峰出现,我们曾使用 400V 的 CID 电压(HP 59987A 上的最高 CID 电压设置),但仍没有显著的碎片产生。而当使用 APCI 接口时,在 CID 电压大于 150V 时,则出现了有一定丰度的 B 环和 C 环开裂产物和相当高丰度的脱水产物,接近 EI 源的质谱开裂程度。

有关 ESI 和 APCI 质谱的开裂规律,目前尚无更多工作被报道。一般而言,同一化合物的 CID 质谱与 EI(electron impact)质谱有一定的区别。可能是由于前者的开裂环境(尤其是 APCI)比 EI 源更为复杂些,诸如脱水、分子离子复合物出现的可能性会更大。

2 应用实例

本文所包括的所有实验结果均是以 HP5989B 质谱仪配套使用 HP59987A 型 ESI/APCI 接口及 HP1090 液相色谱仪完成。主要溶剂为色谱纯度级,色谱分离均使用 ZORBAXC-18 反相柱及类似产品。

2.1 药物代谢研究

2.1.1 人尿中刺激剂 MESOCARB 代谢物的检测

MESOCARB [3-(1-methyl-2-phenylethyl)-N-(phenylamino)carbonyl]-1, 2, 3-oxdiazolium-5-aminide] 属于 N-氨基甲酰斯德酮胺一类的化合物。它虽已经过了作为抗抑郁剂(antide-

pressant) 和刺激剂 (psychostimulator) 的临床实验, 但仍是未经注册的地下药物, 在国外的运动员中有较多的阳性案例。MESOCARB 分子中含有一个内消旋离子杂环 (meso-ionic heterocycles), 分子整体的热稳定性很差, 虽经衍生化处理, 以 GC/MS 方法也只能检出其热解碎片^[8]。由于 MESOCARB 的紫外线吸收具有较强的特征性和较高的消光系数, 故在兴奋剂的常规检测中以 HPLC 配合对上述碎片的 GC/MS 检测加以控制。尿中 MESOCARB 经乙酰化后质谱分析仪检出一个热解产物, 只有碎片 m/z 91、 m/z 119、 m/z 230 和 m/z 299 (图 1)。以这些碎片无法判定检出物是原形药物或是其代谢物。

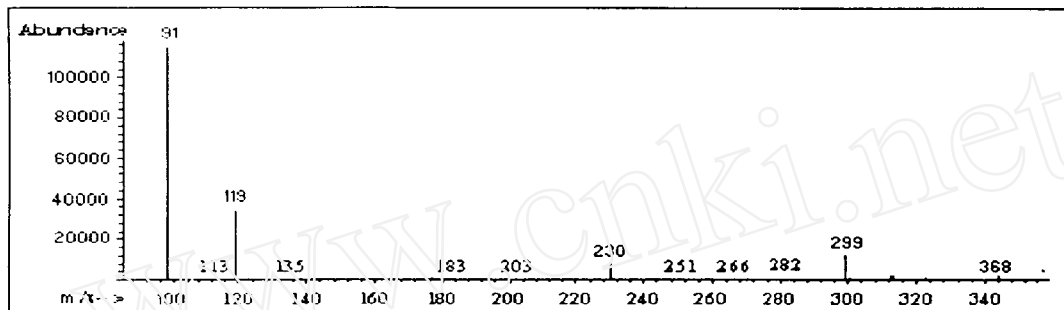


图 1 人尿 MESOCARB 的乙酰化 EI 质谱

以 ESI (+)-LC/MS 方法, 经液相色谱柱分离, 可在经酸解 (6M HCL 1mL, 90℃ 加热一小时) 的人尿中检出一个完整的 MESOCARB 羟基化产物 (图 2), 与 MESOCARB 的标准品质谱对照, 符合位移规则 (图 3)。

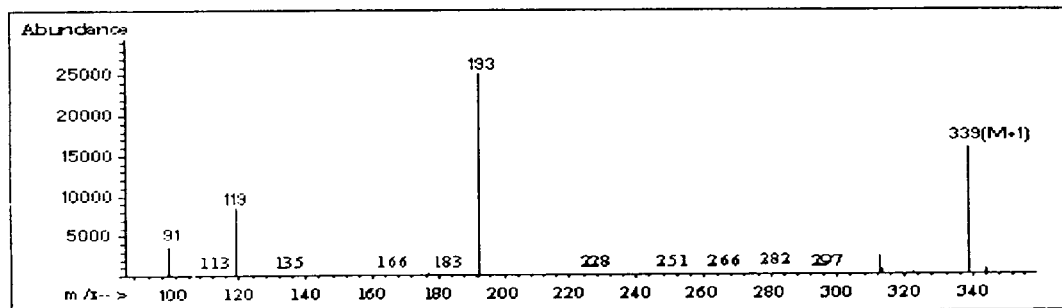


图 2 MESOCARB 羟基代谢物的 ESI (+) 质谱

加大 CID 电压可以有效地增加 MESOCARB 的碎片丰度 (图 4)。

根据对 MASOCARB 的 EI 质谱和 CID 质谱的观察, MESOCARB 的热解断裂与 CID 质谱的主要开裂都与分子中的五元杂环结构有密切的关系。

2.1.2 左旋紫草素体外培养代谢物的检测

左旋紫草素为萘醌类化合物, 是常用中药, 具广谱抗菌, 抗肿瘤, 抗生育等作用。经苯巴比妥对葡萄糖醛酸水解酶诱导后的动物肝脏微粒体可用于药物代谢物的体外培养^[9], 紫草素经此微粒体培养后可用 ESI (-)-LC/MS 检出其两种羟基化产物及少量的原型药物 (图 5~图 8)。ESI (-)-LC/MS 分析中采用了柱后补偿技术 (50 μ L/min 的三乙胺在柱后经 T 型接口均匀加入)。经优化的色谱分离条件可以保证一次进样同时检出紫草素及其两

个主要代谢物。

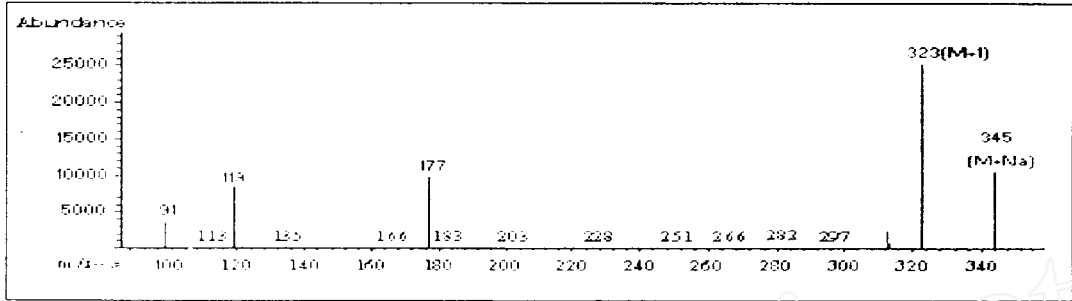


图 3 MESOCARB 标准品的 ESI(+) 质谱 CID80V

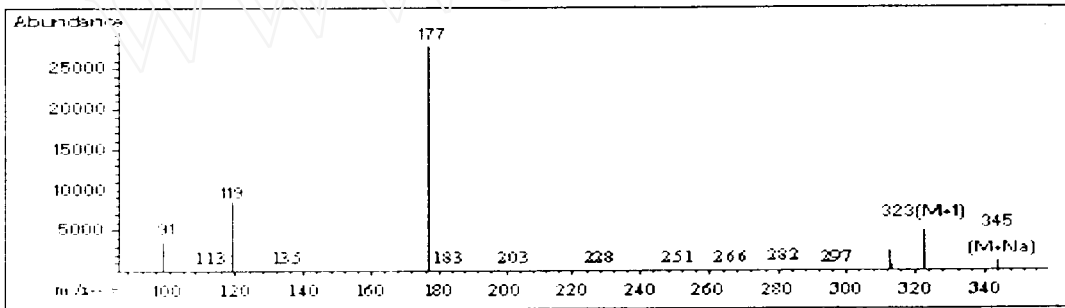


图 4 MESOCARB 标准品的 ESI(+) 质谱 CID150V

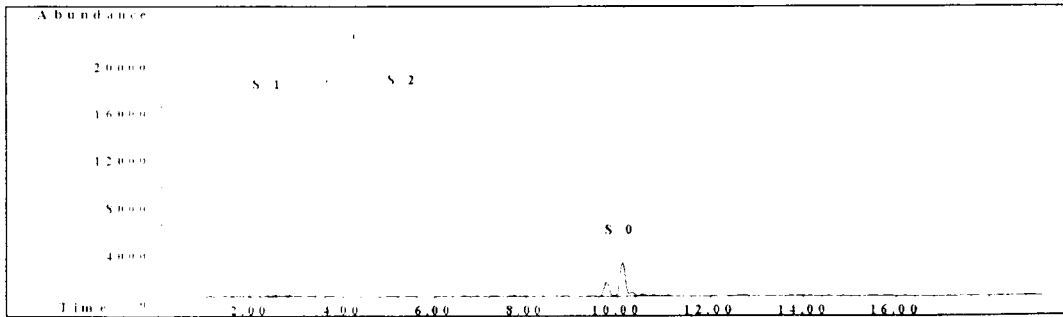


图 5 紫草素 S0 及其代谢物 S1 ~ S3 的 ESI(-) 总离子流图

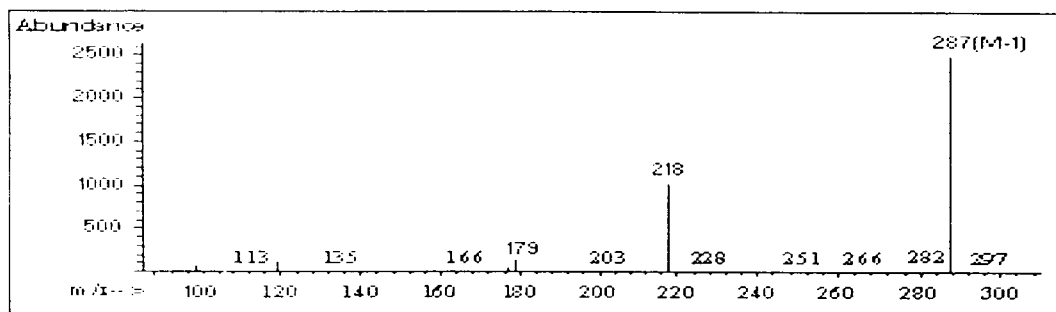


图6 紫草素标准品的ESI(-)质谱

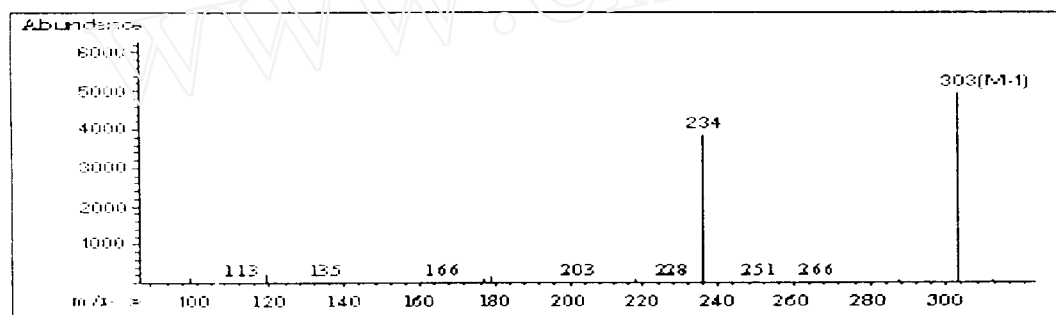


图7 紫草素代谢物S1的ESI(-)质谱

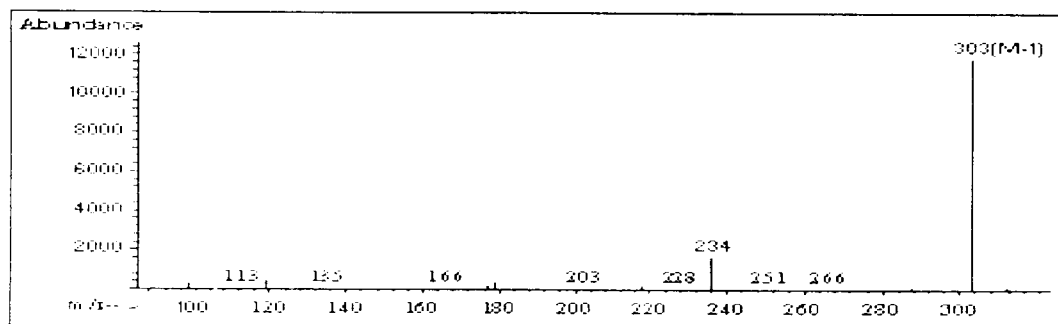


图8 紫草素代谢物S2的ESI(-)质谱

2.1.3 胃液中亚硝酰胺的检测

亚硝酰胺(1-methyl-1-nitroso-N-methyl-N-nitroso-urea, MNU)是一种较强的致癌物质。由于亚硝酰胺可能在食品发酵或腐败过程中自发产生,因而对地区性胃癌高发人群进行针对亚硝酰胺的调查是一件有意义的工作。

亚硝酸胺分子量为 103, 分解温度为 124℃, 用 GC/MS 分析是很困难的。对亚硝酸胺的定性检测可以在 HPLC 工作的基础上以 ESI(+)-LC/MS 来进行。成功检测的关键是对干燥气、喷雾气的流量进行细致的优化以获得较好的离子化效率。

以上述条件在经适当前处理的胃液中可检出一个亚硝酸胺的溶剂化离子, 即 $M+1+$ 乙腈 (m/z 145), 与亚硝酸胺的标准品对照, 二者得到的色谱保留和质谱是完全一致的 (图 9)。

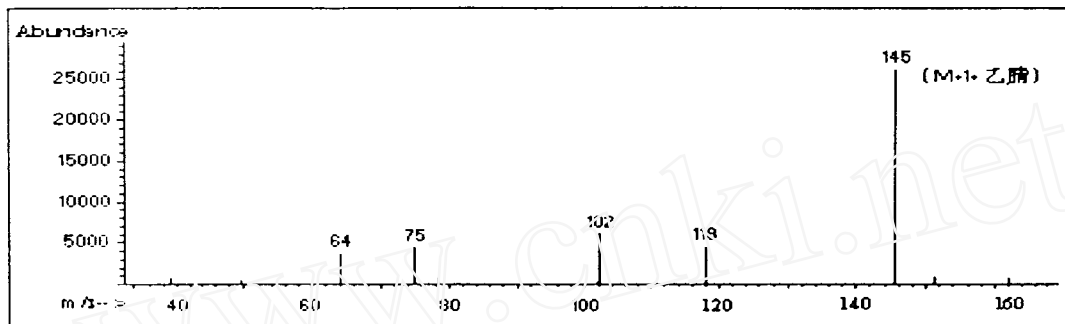


图 9 胃液中亚硝酸胺的 ESI(+)质谱

2.1.4 小分子肽 P6A 的代谢研究

血管源性活性多肽在人体的内源性物质中占有重要地位, 对于一些重大疾病的发生, 发展, 及治疗有重要影响。其中一类小分子多肽与血管内皮, 血小板及纤蛋白相关, 显示出明确的括冠, 抗栓和缩血管作用^[10], P6A 即是此类多肽之一。P6A 为化学方法所合成, 因此在它的有关研究中所用的检测方法将依赖于色谱或质谱技术。

P6A 是一个由 6 个氨基酸组成的小肽, 分子量为 541 道尔顿。

P6A 的 ESI(+)-LC/MS 分析是该药物的血药浓度与结构关系研究的部分工作, 是我们首次以 LC/MS 方法对肽类药物的血药浓度分析进行的尝试。P6A 经尾静脉对小鼠进行 800 μ g 一次注射给药后的血浆样品经适当的化学前处理后, 以反相液相色谱分离并以 (ESI(+)-LC/MS 联机检出其原型药物, 表明 P6A 以原型或与某些蛋白质结合存在于血液中 (图 10)。

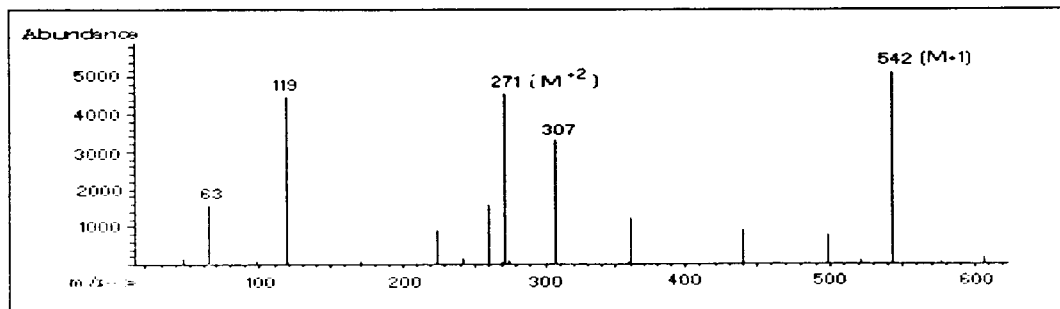


图 10 小鼠血浆中 P6A 的 ESI(+)质谱

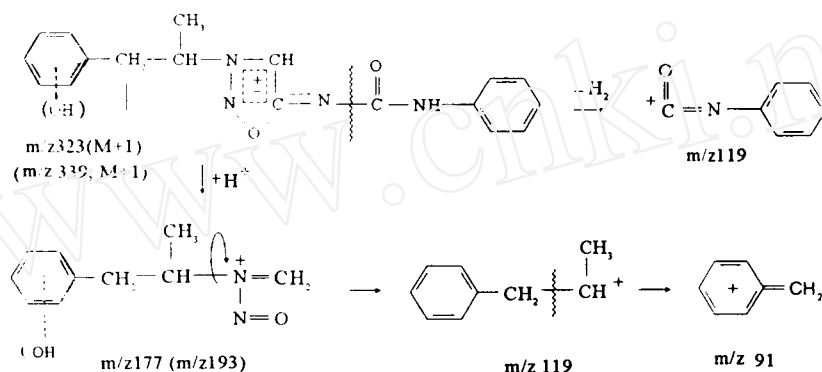
2.2 药物的离子源内 CID 质谱

如上所述, 用 ESI 和 APCI 技术获得的 CID 质谱与用 EI 源所获得的质谱是有所不同的。由于目前没有 CID 谱库用于检索, 质谱的识别要靠对质谱图的解析及在实践中的逐

步积累。本文将对研究工作中所涉及的几个化合物及其代谢物的 CID 质谱进行一定程度的解析。为了获得较高质量的质谱图,这部分工作采用了标准品的流动注射分析,流动相和样品溶剂均采用色谱纯甲醇并做空白加以对照,以避免杂质的干扰。

2.2.1 MESOCARB 及其代谢物的 ESI(+)-CID 质谱开裂产物

MESOCARB 的开裂产物见式 1,分子中的五元杂环是一个不稳定的结构,一定的 CID (碰撞诱导解离)电压即可将其打碎形成碎片 m/z 177,由此产物可进而产生 m/z 119 和 m/z 91,这两个碎片与 EI 质谱中的相同。ESI 谱中分子离子峰 m/z 323 与碎片 m/z 177 的出现增加了质谱定性的可靠程度。MESOCARB 及其羟基化代谢产物的开裂有着相同的方式,如代谢物质谱中的 m/z 339 和 m/z 193,分别是原型药中 m/z 323 和 m/z 177 增加一个羟基的产物。离子化时,质子也可加在分子中羰基的氧上形成 m/z 119 的另一个来源。



2.2.2 二种内源性甾体的 APCI(+)-CID 开裂产物

(1) 睾酮的开裂

甾体类化合物都具有很稳定的稠合环状结构,因此在 ESI(+)-LC/MS 分析中,大多数甾体只能检出分子离子峰(M+1)。采用 APCI 接口则碎片明显增加(图 11),睾酮的质谱中出现了脱水峰以及 B 环和 C 环的开裂产物,如式 2。

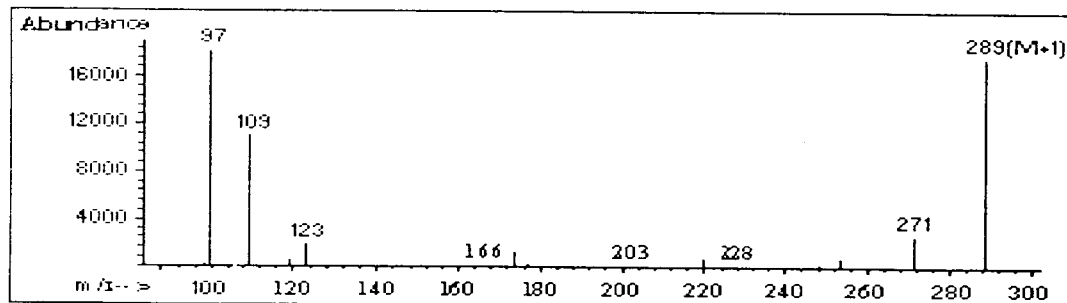
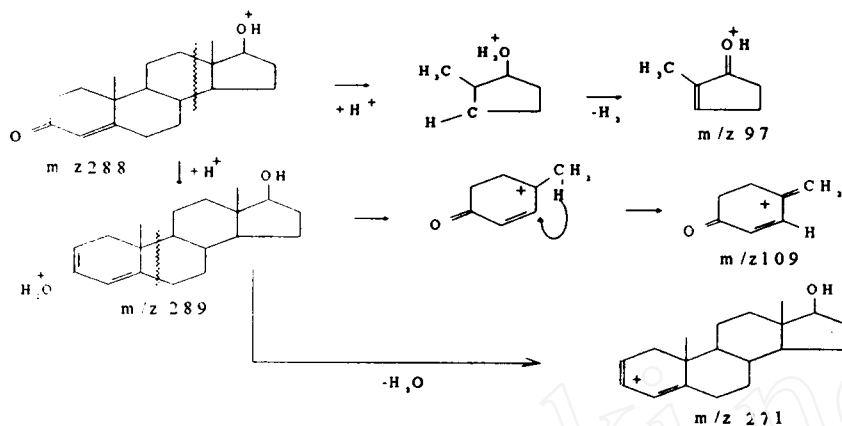


图 11 睾酮标准品的 APCI(+)质谱



式中 $m/z 271$ 为脱去一个水的产物, 实验中也可观察到脱去两个水的产物, 但丰度较小。 $m/z 109$ 为 B 环开裂产物。与 EI 质谱相比, 虽都发生 B 环开裂, 但位置不相同, 碎片质荷比也不同。图中 $m/z 97$ 可能是 C 环的开裂产物, 这在硅烷化后的 EI 质谱中是没有的^[11]。

以同样方法获得的质谱图表明睾酮与其构象异构体表睾酮的 APCI (+)-CID 质谱没有明显区别, 它们的开裂方式可能是完全相同的。

(2) 雄(甾)烷二醇的开裂

雄烷二醇 (5α -Adrostane- $3\beta, 17\beta$ -diol) 也是内源性的甾体化合物, 具有与睾酮相同的甾环母体结构。人尿中可以检出数种不同的雄烷二醇的构象异构体, 它们的检出对滥用药物双氢睾酮的控制具有重要意义^[12]。

雄烷二醇的 APCI (+)-CID 质谱 (图 12) 中主要的碎片为两个脱水产物, 分别为 $m/z 275$ 和 $m/z 257$, 如式 3 所示。丰度很小的 $m/z 291$ 可能是分子离子脱去一分子 H_2 的产物。与睾酮的开裂不同的是, 雄烷二醇没有 B 环和 C 环开裂产物出现。

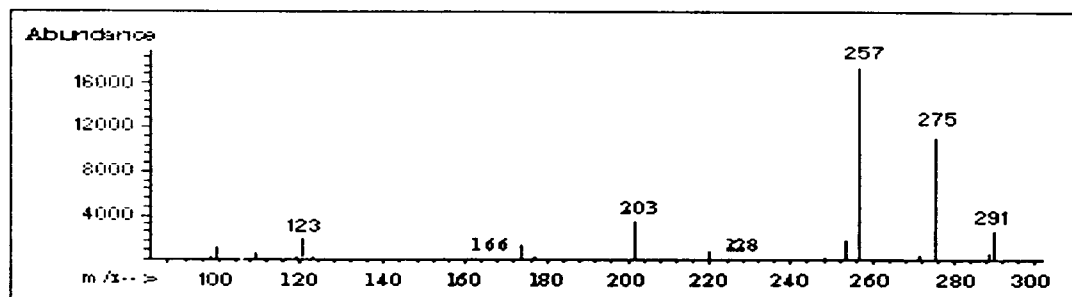
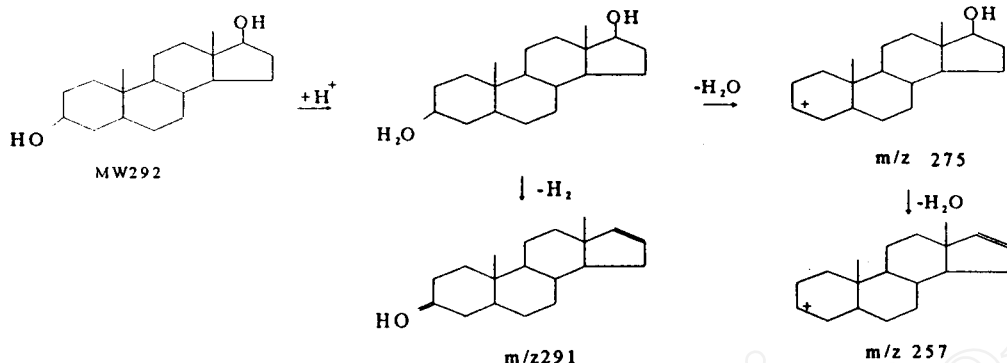


图 12 5α - 3β -雄(甾)烷二醇标准品的 APCI (+) 质谱



2.2.3 杜冷丁的开裂

杜冷丁(pethiding)为强效麻醉镇痛剂,是体育运动中的禁用药物。

杜冷丁的 ESI(+)-CID 开裂(图 13)与 EI 开裂(图 14)很相似,集中于作为侧链的酯基上。如式 4 所示 $m/z 220$ 产生于酯基上一分子乙烯的脱去,而在它的 EI 谱中则是脱去中性乙基游离基而产生 $m/z 218$ 。整个酯基的脱去在两种质谱中是一样的,均产生 $m/z 174$ 。

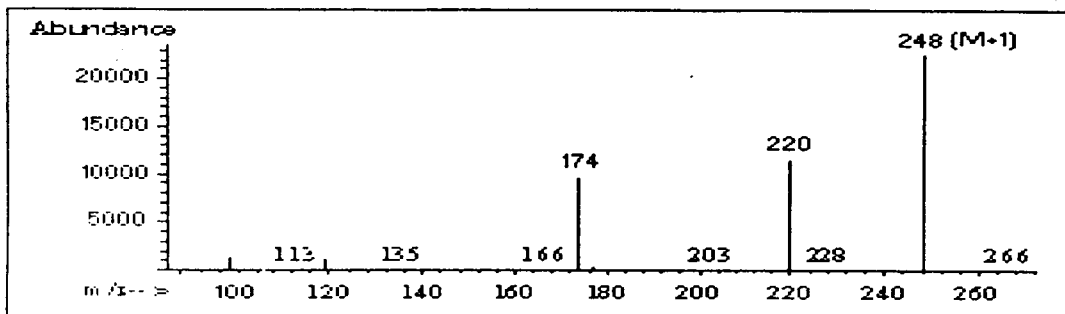


图 13 杜冷丁标准品的 ESI(+)-CID 质谱

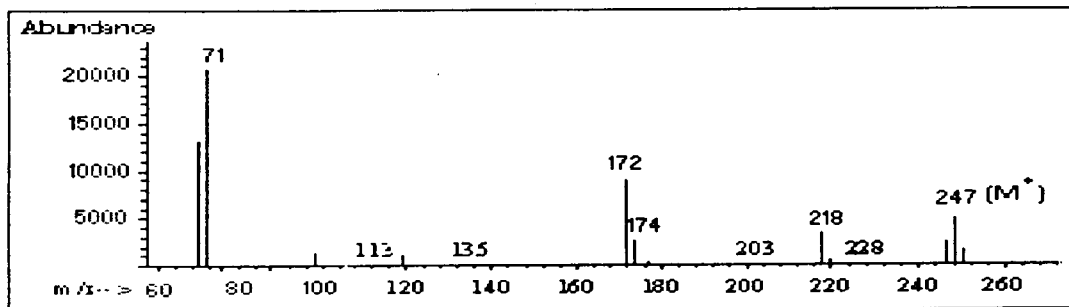
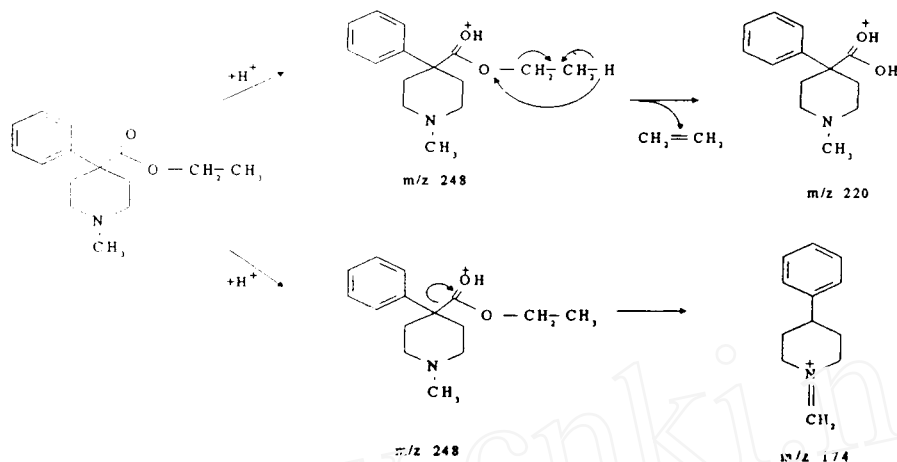


图 14 杜冷丁标准品的 EI 质谱



式 4

2.3 甘草酸的 ESI(-)-LC/MS 质谱

甘草酸是中药甘草的主要活性成分。对甘草酸的 ESI(-)-LC/MS 是以甘草酸为模型进行药物辐射化学研究工作的一部分^[13]。采用 ESI(+)和 ESI(-)均可获得甘草的 LC/MS 信号,但 ESI(-)的灵敏度较好且出现了二价和三价离子峰(图 15)从而使质谱的特征性得到改善。ESI(+)-LC/MS 分析中还证明一定剂量的⁶⁰Co- γ 辐射可使甘草酸分别失去一个配糖基或失去两个配糖基成为甘草次酸^[14]。

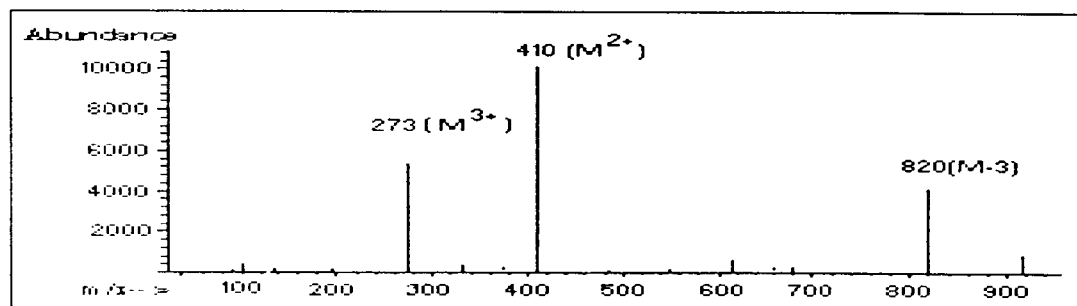


图 15 甘草酸标准品的 ESI(-)质谱

2.4 蛋白质的酸诱导构象变化

蛋白质由于环境 pH 的变化,加热等因素会出现构象上的改变。许多方法可在溶液中用于蛋白这一变性行为的研究,如酸碱滴定,光度法,荧光法以及核磁共振等方法。

以 ESI 为接口的液质联机分析中,多电荷峰的应用可以拓宽以单电荷离子计算的质谱质量范围,从而在单电荷质量范围不大于 2000 道尔顿的质谱上测定近 20 万道尔顿的分子量(以 HP5890B/59987A ESI/MS 为例)。它可以有效地分辨出由同一蛋白分子产生的多个多电荷离子,即反映出蛋白的表面可获得的质子个数,也就是“暴露”在蛋白质表面的

碱基个数,而暴露在表面的碱基个数与蛋白质在一定 pH 环境中的折叠(folding)情况是相关的。

牛胰腺核糖核酸酶 A(bovine pancreatic ribonuclease A, Rnase A)由 124 个氨基酸组成,分子量为 13700 道尔顿。Rnase A 中含有的碱性氨基酸为赖氨酸 10 个,精氨酸 4 个和组氨酸 4 个。Rnase A 是一个被广泛研究的对象,它的蛋白序列和结构及其在酸,热条件下的去折叠行为是已知的^[15]。我们以 ESI(+)-LC/MS 为手段,以酸诱导变性的方法,对它在溶液中的去折叠行为进行了初步观察。

实验表明,当 Rnase A 标准品的溶液 pH 由 3.3(0.1% 醋酸)变化到 2.6%(醋酸)时,多电荷离子峰的分布出现了明显的变化,pH 为 3.3 时可检出的多电荷离子由 +7 价离子到 +11 价离子,最强峰为 +8 价离子,pH 为 2.9(0.5% 醋酸)时,可检出的多电荷离子由 +9 价到 +14 价,其中最强的为 +11 价离子,表明该蛋白的表面电荷数及其荷电状态(charged state)的分布有了明显的改变。继续降低 pH 值到 2.5(4% 醋酸),最高价态离子及其强度和所有多电荷离子峰的分布基本维持不变(图 16)^[16]。

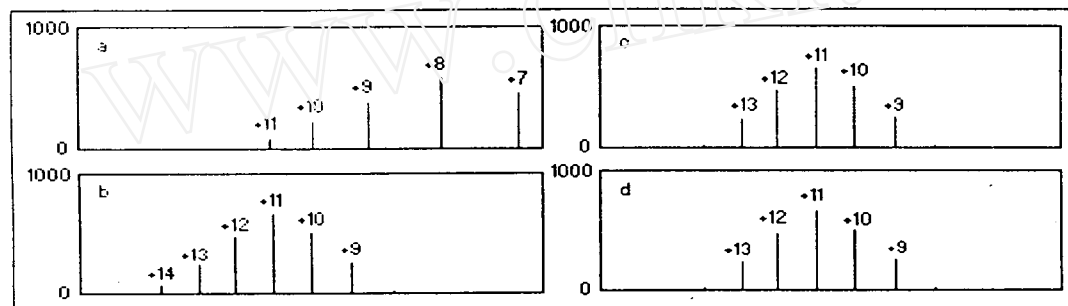


图 16 牛胰腺核糖核酸酶 A 在不同 pH 溶液中的多电荷离子分布

(a 0.1% 醋酸 pH3.3, b 0.5% 醋酸 pH2.9

c 2% 醋酸 pH2.6, d 4% 醋酸 pH2.5)

如上所述,Rnase A 中共含有 18 个可接受质子的碱性氨基酸残基,而 ESI(+)分析可检出的最高价态为 +14,由此可推测,其余 4 个碱性氨基酸在上述 pH 范围内没有足够的“暴露”在蛋白分子的表面上,以至于它无法和溶剂中的质子结合而形成高于 14 价的离子。

这部分工作说明,ESI-LC/MS 可以提供出一个新的、有效的方法来对蛋白质的构象变化作出更为深入的理解。

3 讨论

3.1 ESI/APCI 的适用对象

ESI:适用于高极性、热不稳定化合物,符合路易斯理论定义的有机酸、碱。

APCI:适用于中等极性化合物分子中不含酸、碱性基团的化合物,如碳氢化合物、醇类、酯类等。

3.2 离子化方式

ESI:溶液中及在气相中的质子交换,其中含酸、碱性基团的化合物其离子化可以在溶液内预先完成。

APCI:包含溶液中的质子交换,气相中的质子交换及电子交换,可用通式表示为:

质子交换: $\text{RH}^+ + \text{T} \rightarrow \text{TH}^+ + \text{R}$ $\text{R}^- + \text{TH} \rightarrow \text{T}^- + \text{RH}$

电子交换: $\text{R}^+ + \text{T} \rightarrow \text{T}^+ + \text{R}$ $\text{R}^- + \text{T} \rightarrow \text{T}^- + \text{R}$

实际过程中的质子交换是分别以水合质子和质子水簇状物的形式进行的:

$\text{H}_3\text{O}^+ (\text{H}_2\text{O})_n + \text{T} \rightarrow \text{TH}^+ (\text{H}_2\text{O})_m + (n-m-1)\text{H}_2\text{O}$

$\text{TH}^+ (\text{H}_2\text{O})_m$ 中的水以辅助气体或一定程度的真空将其“剥离”:

$\text{TH}^+ (\text{H}_2\text{O})_m \rightarrow \text{TH}^+ + m(\text{H}_2\text{O})$

3.3 离子的预形成

如上所述,离子的预形成在离子化机制的讨论中做为离子成因的一部分。由此出发,在实际工作中经常在有机酸或碱的样品中加入挥发性碱和酸(如甲酸,乙酸,氢氧化铵,三乙胺等)使其预先形成离子。溶质固有酸度及溶剂的酸碱性(质子自递作用)可以用来预见和解释大部分化合物的离子预形成。离子预形成的一般原则为:

酸性化合物 + 碱性溶剂 $\rightarrow \text{M}^-$

碱性化合物 + 酸性溶剂 $\rightarrow \text{M}^+$

酸性或碱性化合物 + 两性溶剂 $\rightarrow \text{M}^+$ 或 M^- (两性溶剂如水、醇类)

除可被定义为有机酸碱的化合物以外,仍有某些化合物并无明显的酸碱性可言,但它们在质子自递作用很弱的乙腈中仍可在电喷雾中分析中出现很好的信号,此时样品中已无须再加入任何挥发性酸碱。

3.4 流速匹配

一般而言,流动相流速增加则检出灵敏度降低。实际工作中,如采用 2mm 内径的液相柱,以 0.20.5mL/min 的流速进行分离和质谱测定,对于许多化合物可获得纳克级(0.1 ~ 0.01 μg ,全扫描)的检出,这一流速可以兼顾良好的色谱分离和离子化效率。流速每增加 100 μL ,灵敏度会有明显的下降,因此 4.6mm 内径的液相柱不大适合于液质联用分析。ES 和 APCI 分析,尤其是 ESI 分析,采用内径 2mm 的液相柱可方便地获得适合于分离和检出的流速匹配。当然在某些特殊情况下,采用微径柱(内径为 0.1mm ~ 0.3mm)可以在每分钟数十微升的流速下工作,并获得较高的灵敏度和好的分离。

3.5 辅助气的流速和温度

辅助气的气流量的确定主要由流动相的流速和性质决定,流动相流速大则辅助气流要相应地加大。如采用水或水为主的流动相也要适当的增加辅助气流。但也要注意,过大的辅助气流会阻碍电场内迁移速率小的离子(分子量大的单电荷离子)进入毛细管,造成灵敏度损失。

辅助气温度的设置要优先考虑被分析化合物的热稳定性,某些热不稳定化合物的分解临界温度范围是很小的,此时要做细致的温度优化。

3.6 溶剂的选择

(1) 诸如甲醇、水以及醋酸、甲酸的铵盐缓冲液为最常用的溶剂,原因是它们具有:

- 显著的质子自递作用,有利于离子在溶液中的预形成;
- 适中的介电常数,避免喷口放电(放电会导致喷口毛细管损坏);
- 挥发性强,易脱去;
- 乙腈在 APCI 分析中更为常用,因它有较好的电子交换作用。

(2) 某些难挥发盐的缓冲液在 ESI 和 APCI 分析中是禁用的,如磷酸盐缓冲液,但也有人在实验中采用,且有较好的信号出现。使用时要避免过高浓度以防出现放电。三氟乙酸是蛋白或肽类在进行液相分离时最常用的离子对试剂(0.01% ~ 0.1% TFA 水溶液),有

许多报道说三氟乙酸会严重的压制信号,故采用液相柱后补偿,如异丙醇,以一定的流速经一个死体积小 T 型接口喷入电离盒,抵消三氟乙酸对信号的压制。由于对三氟乙酸的影响有不同的看法,最好根据不同的化合物决定是否采用补偿技术。

柱后补偿技术还可以灵活地用于实际分析中,如我们在紫草素代谢物的分析中即采用了三乙胺柱后补偿,解决了在酸性介质下分离和在碱性介质中进行 ESI(-)检测的矛盾。

由以上讨论可知,ESI 和 APCI 分析中要加以细心选择优化的,同时也有较大选择余地的是流动相的组成。

3.7 单级质谱的噪声

以 ESI 和 APCI 为接口的单级四极杆质谱,其噪声是最难以解决的问题。实际工作中,纳克级的信号常常被“淹没”在很高的噪声中,在低质量范围内测定时更是如此。噪声的来源可能为:

- a) 溶剂中的杂质;
- b) 辅助气和喷雾气中的杂质;
- c) 高分子聚合物中含有的增塑剂及其他杂质;
- d) 复杂的生物学基质。

其中,溶剂杂质形成的噪声似乎是最难以解决的问题,因为目前生产商尚不能提供出适合 ESI 和 APCI 使用的溶剂。市售的色谱纯溶剂仅是对光学检测器而言,这种试剂中可能含有某些能在 ESI/APCI 上产生很强信号的杂质。

参 考 文 献

- 1 M Takekiyo, R M Caprioli, M L Gross, S Yousuke. *Biological Mass Spectrometry-Present and future*, 43 ~ 49, by John Wiley & Sons Ltd Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England
- 2 J V Iribarne, B A Thomson. On the Evaporation of Small Ions from Charged Droplets, *J Chem Phys*, 1976, 64:2287
- 3 T Nohmi, J B Fenn. *J M Chem Soc*, 1992, 114:3241
- 4 M A Kelly, M M Vestling, C C Fenselau, P B Smith. *Org Mass Spectrom*, 1992:1143 ~ 1145
- 5 S K Chowdhury, V Katta, B T Chait. *J Am Chem Soc*, 1990, 112:9012
- 6 J D Henion, B A Thomson, P H Dawson. Determination of Sulfa Drugs in Biological Fluids by HPLC/MS/MS. *Anal, Chem*, 1982, 54:451
- 7 E C Horning, D I Carroll, I Dzidic, S N Lin, R N. Stillwell, JP Thenot. Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry-studies of negative ion formation for detection and quantification purpose. *J Chromatog*, 1977, 142:481
- 8 S M Yang. Determination of Mesocarb in Urine by HPLC and GC-MSD. 10th Cologne Workshop on Dope Analysis, 1992. 199 ~ 212
- 9 Aw Ford-Hutchinson. *Trends Pharmacol Sci*, 1991, 12:68
- 10 汤健,唐朝枢. 循环系统的内分泌功能,北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,76 ~ 90
- 11 J Pflieger, H H Maurer, A Weber. *Mass Spectral and GC Data of Durgs, Poisons, Pesticides, Pollutants and Their Metabolites* VCH Verlagsgesellschaft mbH, D - 6940 Weinheim. 1900 (spectrum of testosterone enol 2TMS)
- 12 A T Kicman, S B Coutts, C J Walker, D A Cowan. Detection of Dihydrotestosterone Administration in Sports. 4th Permanent World Conference on Anti - Doping in Sports, 1993, London
- 13 吴季兰,戚生初. 辐射化学,原子能出版社
- 14 陈畅. 北京大学技术物理系博士研究生学位论文
- 15 W Liu, C L Tsou. *Biochem Biophys Acta*, 1987, 916:455 ~ 464

- 16 X M Pam, X R Shen, Shen, S M Yang, J M Zhou. Probing Subtle Acid - Induced Conformational Changes of Ribonuclease A by Electrospray Mass Spectrometry. FEBS Letters, 1997, 402: 25 - 27

Application of LC/MS with ESI/APCI Interface

Yang Shumin

(National Institute of Sports Medicine, Beijing 100029, China)

Received 1997-10-27

Abstract

This paper is an introduction for the usage of LC/MS with ESI (air pressure ionization) and APCI (air pressure chemical ionization) as interface. All the material is from our work on LC/MS and doping test during the recent years. As example the work on drug metabolism, conformational change of protein in solution as well as some analysis for labile compounds are presented in the paper and some practical problems are discussed.

Key words: air pressure ionization, electrospray, air pressure chemical ionization, liquid chromatography/mass spectrometry