

0431 质谱法

质谱法是使待测化合物产生气态离子，先将物质离子化，再按质荷比(m/z)将离子分离，通过测量离子的质荷比和谱峰响应强度而实现分析目的。检测的一种分析方法。检测限可达 $10^{-15} \sim 10^{-12}$ mol数量级。质谱法可提供分子质量和结构的信息，定量测定可采用内标法或外标法。质量是物质的固有特征之一，不同的物质有不同的质量谱，利用物质的上述性质，可进行定性分析。利用物质的质谱峰响应强度与其物质的量之间的相关性，可进行定量分析。根据样品中的待测成分可分为无机质谱、有机质谱和同位素质谱。

质谱仪的主要组成如图所示。主要由进样系统、离子源、质量分析器、检测器、真空系统、控制和数据处理系统组成(如图)。在由泵维持的约 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ Pa真空状态下，离子源产生的各种正离子(或负离子)，真空系统由机械泵、扩散泵或分子泵、阀门等组成。在真空条件下，离子源产生的正离子或负离子，经加速，进入质量分析器分离，再由检测器检测。计算机控制和数据处理系统用于控制仪器，记录、处理并储存数据，当配有标准谱库软件或数据库软件时，计算机系统可以将测得的质谱图谱或数据与标准谱库中图谱或数据比较，获得样品中待测成分可能化合物的组成和结构信息。

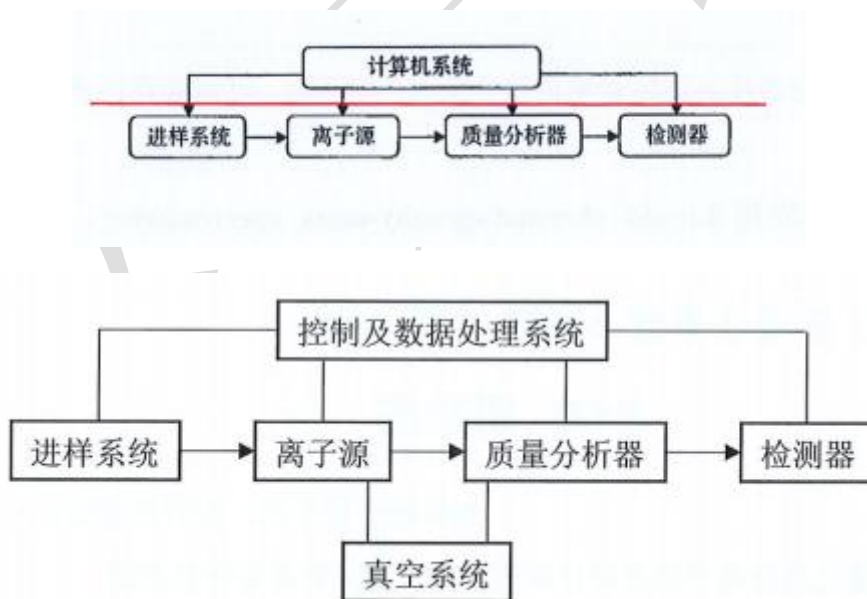


图 质谱仪的主要组成

一、进样系统

样品导入应不影响质谱仪的真空度。进样方式可分为直接进样和联用进样，选用的进样方式的选择取决于样品的性质、纯度及所采用的离子化方式。多种分离技术或其他技术已实现与质谱的联用，经分离后或经其他技术处理的待测成分，通过适宜的接口引入质谱仪分析。样品引入应不影响质谱仪的真空度。

1. 直接进样

室温常压下，气态或液态样品中化合物的中性分子通过可控漏孔系统，进入离子源。吸附于在固体上或溶解于在液体中的挥发性待测化合物成分，可采用顶空分析法提取和或富集，经程序升温解吸附后，再经由毛细管导入质谱仪。

挥发性固体样品可置于进样杆顶端，在接近离子源的高真空状态下加热、气化。采用解吸离子化技术，可以使热不稳定的、难挥发的样品在气化的同时实现离子化。

~~多种分离技术已实现了与质谱的联用。经分离后的各种待测成分，可以通过适当的接口导入质谱仪分析。~~

2. 联用进样

2.1 气相色谱-质谱联用(Gas chromatography - mass spectrometry, GC-MS)

~~在当使用毛细管气相色谱柱及大容量质谱真空泵时的情况下，可直接将色谱流出物可直接引入质谱仪。~~

3.2.2 液相色谱-质谱联用(Liquid chromatography - mass spectrometry, LC-MS)

使待测化合物成分从色谱流出物中分离，并形成适合于质谱分析的气态分子或离子需要特殊的接口特定的离子源，如电喷雾离子源、大气压化学离子源等。为减少污染，避免化学噪声和电离抑制，流动相中所含的缓冲盐或添加剂通常应具有挥发性，且用量也有一定的限制并尽量减少用量。

~~(1)粒子束接口—液相色谱的流出物在去溶剂室雾化、脱溶剂后，仅待测化合物的中性分子被引入质谱离子源。粒子束接口适用于分子质量小于1000道尔顿的弱极性、热稳定化合物的分析，测得的质谱可以由电子轰击离子化或化学离子化产生。电子轰击离子化质谱常含有丰富的结构信息。~~

~~(2)移动带接口—流速为0.5~1.5ml/分钟的液相色谱流出物，均匀地滴加在移动带上，蒸发、除去溶剂后，待测化合物被引入质谱离子源。移动带接口不适宜于极性大或热不稳定化合物的分析，测得的质谱可以由电子轰击离子化或化学离子化或快原子轰击离子化产生。~~

~~(3)大气压离子化接口—是目前液相色谱-质谱联用广泛采用的接口技术。由于兼具离子化功能，这些接口将在离子源部分介绍。~~

4.2.3 超临界流体色谱-质谱联用(Supercritical fluid chromatography - mass spectrometry, SFC-MS)

~~超临界流体色谱-质谱联用主要采用大气压化学离子化或电喷雾离子化接口。采用电喷雾离子源或大气压化学离子源等。色谱流出物通过色谱柱一个位于柱子和离子源之间的加热线流器转变为气态后，引入质谱仪分析。~~

5.2.4 毛细管电泳-质谱联用(Capillary electrophoresis - mass spectrometry, CE-MS)

~~几乎所有的毛细管电泳操作模式均可与质谱联用。选择接口时，电喷雾离子源是最常用的接口。采用不同的毛细管电泳操作模式与质谱联用时，应注意毛细管电泳的低流速特点，~~

并使用挥发性缓冲液。电喷雾离子化是毛细管电泳与质谱联用最常用的接口技术。

二、离子源

根据待测化合物成分的性质及拟获取的信息类型，可以选用不同的离子源。电子轰击离子源、电喷雾离子源和基质辅助激光解吸离子源等是最常用的离子源。

1. 电子轰击离子源化 (Electron impact ion source, EI)

处于离子源内的气态待测化合物成分分子，受到一束在能量（通常是70eV）大于其电离能的电子轰击下而离子化。质谱中往往含有待测化合物成分的分子离子及具有待测化合物结构特征的其碎片离子。电子轰击离子化适用于热稳定的、易挥发待测成分化合物的离子化，是气相色谱-质谱联用最常用的离子源化方式。当采用粒子束或移动带等接口时，电子轰击离子化也可用于液相色谱-质谱联用。

2. 化学离子源化 (Chemical ion source, CI)

离子源中的甲烷、异丁烷和氨气等试剂气分子（如甲烷、异丁烷和氨气）受在高能电子轰击下离子化，进一步发生离子-分子反应，产生稳定的试剂气离子，再使待测化合物成分离子化。化学离子化可产生待测化合物成分（M）的 $(M+H)^+$ 或 $(M-H)^-$ 特征离子或待测化合物成分与试剂气分子产生的加合离子。与电子轰击离子源化质谱相比，化学离子源获得的质谱中碎片离子较少，适用于采用电子轰击离子化无法得到分子质量信息的热稳定的、易挥发待测成分的离子化化合物分析。

3. 快原子轰击 (Fast atom bombardment, FAB)或快离子轰击离子源化 (Liquid secondary ion mass spectrometry, LSIMS)

氙气等高能中性原子（如氙气）或高能铯离子，将使置于金属表面、分散于甘油等惰性黏稠基质（如甘油）中的待测化合物成分离子化，产生 $(M+H)^+$ 或 $(M-H)^-$ 特征离子或待测化合物成分与基质分子的加合离子。快原子轰击或快离子轰击离子化非常适合于各种适用于样品中极性的、热不稳定化合物待测成分的分子质量测定及结构表征，广泛应用于分子质量高达10 000u道尔顿的肽、抗生素、核苷酸、脂质、有机金属化合物及表面活性剂的分析。

快原子轰击或快离子轰击离子化当用于液相色谱-质谱联用时，需在色谱流动相中添加1%~10%的甘油，并采用1~10ul/min的且必须保持很低流速（1~10μl/分钟）。

4. 基质辅助激光解吸离子源化 (Matrix - assisted laser desorption ion source, MALDI)

将溶于适宜当基质中的样品供试品涂布于金属靶上，经用高强度的紫外或红外脉冲激光照射后，实现使待测成分化合物的离子化。基质辅助激光解吸离子化主要可用于分子质量在100 000u道尔顿以上的生物大分子分析，适宜与飞行时间质量分析器结合使用。

5. 电喷雾离子源化 (Electric spray ion source, ESI)

离子化在大气压下进行。将待测成分的溶液或待测溶液（如液相色谱流出物）经加载高电压的通过一终端加有几千伏高压的毛细管引入离子源，气体辅助雾化，产生的微小液滴去溶剂后，形成单电荷或多电荷的气态离子。这些气态离子再经逐级减压区域，从大气压状态传送到具有高真空度的质量分析器中质谱仪的高真空中。电喷雾离子化可在1μl/分钟~1ml/分钟流速下进行，适合极性化合物和分子质量高达100 000道尔顿的离子化生物大分子研究，是液相色谱-质谱联用、毛细管电泳-质谱联用的常用离子源最成功的接口技术。

6. 大气压化学离子源化 (Atmospheric pressure chemical ion source, APCI)

原理与化学离子源化相同，但离子化在大气压下进行。流动相在热待测组分的溶液或色谱流出物在高温及氮气流的作用下雾化成气态，经由带有几千伏高压的放电电极时离子化，产生的试剂气离子与待测化合物成分分子发生离子-分子反应，形成单电荷离子。正离子通常是 $(M+H)^+$ ，负离子则是 $(M-H)^-$ 。大气压化学离子化能够在流速高达2ml/分钟下进行，常用于分析分子质量小于1500道尔顿的小分子或弱极性化合物，主要产生的是 $(M+H)^+$ 或 $(M-H)^-$ 离子，很少有碎片离子，是液相色谱-质谱联用的重要离子化技术之一。通常在较高流速下进行，有时可高达2ml/min。接口之一。

7. 大气压光离子源化 (Atmospheric pressure photo ion source, APPI)

与大气压化学离子化不同，大气压光离子化是利用光子将气相分子离子化，该离子化源主要用于非极性化合物的离子化物质的分析，是电喷雾离子源化、大气压化学离子源化的一种补充。大气压光离子源化对于试验条件比较敏感，掺杂剂、溶剂及缓冲溶液的组成等均会对测定的选择性、灵敏度产生较大显著影响。

三、质量分析器

质量范围、质量准确度和分辨率是质量分析器的两个主要性能指标。质量范围指质量分析器所能测定的质荷比下限和质荷比上限之间的范围。质量准确度是指测量质荷比与理论质荷比之间的偏差。分辨率是表示质量分析器对相邻两个质谱峰的区分分辨相邻的质量差异很小的峰的能力。虽然不同类型的质量分析器对分辨率的具体定义存在差异，高分辨质谱仪通常指其质量分析器的分辨率大于 10^4 。四极杆质量分析器、离子阱质量分析器、飞行时间质量分析器和傅里叶变换质量分析器等是最常用的质量分析器。

1. 扇形磁场质量分析器 (Magnetic sector mass analyzer)

离子源中产生的离子经加速电压 (V) 加速，聚焦进入扇形磁场 (磁场强度B)。在磁场的作用下，不同质荷比的离子发生偏转，按各自的曲率半径 (r) 运动：

$$m/z = B^2 r^2 / 2V$$

改变磁场强度，可以使不同质荷比的离子具有相同的运动曲率半径 (r)，进而通过狭缝出口，达到检测器。

扇形磁场分析器可以检测分子质量高达15 000u道尔顿的单电荷离子。当与静电场质量分析器结合、构成双聚焦扇形磁场质量分析器时，分辨率可达到 10^5 。

2. 四极杆质量分析器 (Quadrupole mass analyzer, Q)

分析器由四根平行排列的金属杆状电极组成。直流电压 (DC) 和射频电压 (RF) 作用于电极上，形成了高频振荡电场 (四极场)。在特定的直流电压和射频电压条件下，一定质荷比的离子可以稳定地穿过四极场，到达检测器。改变直流电压和射频电压大小，但保持其维持它们的比值恒定，可以实现质谱扫描。

四极杆质量分析器可检测的分子质量上限通常是4000u道尔顿，分辨率约为 10^3 。

3. 离子阱质量分析器 (Ion trap mass analyzer, IT)

可分为三维离子阱质量分析器 (3D ion trap) 及线性离子阱质量分析器 (Linear ion trap, LIT)。

三维离子阱质量分析器由一对环形电极和两个呈双曲面形的端盖电极组成。四极离子阱 (QIT) 由两个端盖电极和位于它们之间的环电极组成。端盖电极接地处在电位，在两个环

形电极上施加射频电压(RF)，以形成三维四极场。逐渐增大射频电压的最高值，质荷比从小到大的离子逐次进入不稳定区，由端盖极上的小孔射出。选择适当的射频电压，四极场可以储存质荷比大于某特定值的所有离子。采用“质量选择不稳定性”模式，提高射频电压值，可以将离子按质量从高到低依次射出离子阱。挥发性待测成分化合物的离子化和质量分析可以在同一四极场内完成。通过设定时间序列，单个四极离子阱可以实现多级质谱(MS^n)的功能。

线性离子阱质量分析器(LIT)是三维四极离子阱，结构上等同于与四极杆质量分析器等同，但操作模式与三维离子阱质量分析器相似。四极线性离子阱质量分析器具有更好的离子储存效率和储存容量，可改善的离子喷射效率及并更快的扫描速度和较高的检测灵敏度。

离子阱质量分析器与四极杆质量分析器具有相近的质量范围上限及分辨率。

4. 飞行时间质量分析器(Time-of-flight mass analyzer, TOF)

具有相同动能、不同质量的离子，因飞行速度不同而实现分离。当飞行距离一定时，离子飞行需要的时间与质荷比的平方根成正比，质量小的离子在较短时间先到达检测器。为明确起始飞行时间并测定飞行时间，将离子以不连续的组将离子引入质量分析器，以明确起始飞行时间。离子组可以由基质辅助激光解吸离子化等脉冲式离子化(如基质辅助激光解吸离子化)产生，也可通过门控系统连续产生的离子流在给定时间引入飞行管。

飞行时间分析器的质量分析上限约15 000u道尔顿、离子传输效率高、(尤其是谱图获取速度快)、质量分辨率大于 $>10^4$ 。

5. 离子回旋共振分析器(ICR)傅里叶变换质量分析器(Fourier transform mass analyzer, FTMS)

主要有傅里叶变换离子回旋共振质量分析器(Fourier transform ion cyclotron resonance mass analyzer, FTICR)和傅里叶变换静电场轨道阱质量分析器(Fourier transform orbitrap mass analyzer)

傅里叶变换离子回旋共振质量分析器是在高真空($\sim 10^{-7}$ Pa)状态下，离子在超导磁场中作回旋运动，运行轨道随着共振交变电场而改变。当交变电场的频率和离子回旋频率相同时，离子被稳定加速，轨道半径越来越大，动能不断增加。关闭交变电场，轨道上的离子在电极上产生交变的镜像电流。利用计算机进行傅立叶变换，将镜像电流信号转换为频谱信号，获得质谱。待测化合物的离子化和质量分析可以在同一分析器内完成。离子回旋共振分析器的质量范围分析上限 $>10^4$ 道尔顿大于10 000u，分辨率高达 10^6 ，质荷比测定精确到千分之一，可以进行多级质谱(MS^n)分析。

傅里叶变换静电场轨道阱质量分析器形如纺锤体，由纺锤体中心内电极和左右两个外纺锤半电极组成。当中心电极逐渐施加直流高压后，阱内产生特殊几何结构的静电场。当离子进入静电场轨道阱后，受到中心电场的引力，以及垂直方向的离心力和水平方向的推力，沿中心内电极做水平和垂直方向的振荡。外电极检测离子振荡产生的感应电势，通过傅里叶变换将其转换为质谱信号。质量范围上限可达10 000u，分辨率高达 10^5 。

6. 串联质谱($MS-MS$)

串联质谱是时间上或空间上两级以上质量分析器的结合，测定第一级质量分析器中的前体离子(precursor-ion)与第二级质量分析器中的产物离子(product-ion)之间的质量关系。

多级质谱实验常以 MS^n 表示。

五、数据采集方式

1.全扫描（Full scan）是获得一级质谱的数据采集模式。通过对设定 m/z 范围内的全部离子进行扫描并记录质谱图，获得待测成分的准分子离子和分子量信息。

2.数据非依赖扫描（Data - independent acquisition , DIA）是获得二级质谱的数据采集模式。不预先挑选前体离子，将设定的 m/z 范围内的离子进行碎裂获得二级质谱，理论上能够获取所有前体离子的二级质谱。

3. 数据依赖扫描（ Data - dependent acquisition , DDA）是获得二级质谱的数据采集模式。选择满足一定条件的前体离子触发二级碎裂。常见的前体离子选择原则包括丰度、电荷、动态排除和背景扣除等。这种预先筛选前体离子的扫描模式能够排除非目标离子的干扰。

3.1 产物离子扫描（product-ion scan）在第一级质量分析器中选择某 m/z 的离子作为前体离子，测定该离子在第二级质量分析器中、一定 m/z 的质量范围内的所有碎片离子（~~产物离子~~）的质荷比与相对强度，获得该前体离子的质谱。

3.2 前体离子扫描（precursor-ion scan）在第二级质量分析器中选择某 m/z 的产物离子，测定在第一级质量分析器中、一定 m/z 的质量范围内所有能产生该碎片离子的前体离子。

3.3 中性丢失扫描（neutral-loss scan）以恒定的质量差异，在一定的 m/z 质量范围内同时测定第一级、第二级质量分析器中的所有前体离子和产物离子，以发现能产生特定中性碎片（~~如 CO_2~~ ）丢失的待测成分化合物或同系物。

3.4 选择离子监测（ Selected ion monitoring , SIM ） 选择能够表征待测成分的一个离子进行检测。

3.5 选择反应~~性~~监测(selected-reaction monitoring, SRM) 选择第一级质量分析器中某前体离子（ m/z ）₁，测定该离子在第二级质量分析器中的特定产物离子（ m/z ）₂的强度，以定量分析复杂混合物中的低浓度待测成分化合物。

3.6 多反应~~性~~监测(multiple-reaction monitoring, MRM) 是指同时检测两对及以上的前体离子-产物离子。

六、仪器确证

质谱仪和色谱 - 质谱联用仪的确证可分为安装确证（Installation qualification , IQ）、运行确证（Operational qualification , OQ）和性能确证（Performance qualification , PQ）。安装确证是确认相关硬件和软件已安装在适宜地点并能够正常开机运行。运行确证一般通过有代表性的关键仪器参数的运行，证明仪器运行指标符合要求。性能确证是通过标准物质或标准样品的分析，证明仪器的整体性能符合设计要求。

用于定性分析时，仪器的质量准确度是性能确证的重要指标。。用于定量分析时，性能确证主要关注准确度和精密度。对已知标准的单电荷离子，误差应小于 $\pm 0.50u$ 。为了实现建立的测量标准的良好控制，应根据使用的仪器和方法，制定相应的精密度判定标准。在全面考察质谱仪器的性能时，应根据使用的仪器和用途，选择适宜的方法、判定标准和时间间隔。

七、方法验证与确认

在方法验证中，应根据测量的质量属性，确定验证的性能参数，通常包括方法的专属性（亦称特异性）/ 选择性、基质效应、准确度、精密度、范围（包括校正曲线和范围低限）、耐用性等。为实现仪器在整个生命周期内的性能稳定性和可靠性，建议对所选质谱法的输出结果进行持续监测，确保分析结果的准确与可靠。

开展方法确认时，应根据用途对方法的专属性、准确度、精密度和定量限进行评价。

四八、测定法

在进行供试样品分析前，应对测定用单级质谱仪或串联质谱仪进行质量校正。可采用参比物质单独校正或与被测物混合测定校正的方式。

1. 定性分析

质谱法可用于药物、复杂代谢物和蛋白质等的分子量测定和结构鉴定。色谱-质谱联用法还广泛用于鉴定复杂基质中的药物及其代谢物、表征药物的杂质谱等研究。

1.1. 系统适用性

定性分析时，应考虑分辨率、质量范围和质量准确度，并根据分析方法的具体应用，对下列性能指标进行考察。

分辨率：质谱仪的单位质量分辨率应作为系统适用性试验参数。仪器性能确认程序对分辨率的要求能满足一般定性分析要求。

质量准确度：对于待测成分的单电荷离子，与标准样品相比， $\pm 0.50u$ 的质量准确度能满足一般定性分析要求。当需更高的质量准确度时，可另行规定判定标准。

1.2. 数据采集和分析

以质荷比为横坐标，以离子的相对丰度为纵坐标，测定待测成分物质的质谱。高分辨质谱仪可以测定待测成分物质的准确分子质量。

在相同的仪器及分析条件下，直接进样或联用流动注射进样，分别测定对照品和供试品并比较待测样品和标准样品的质谱数据。观察特定 m/z 处离子的存在，使用高分辨质谱、比对二级质谱信息或色谱保留时间，均可有效提高定性分析的准确性。质谱定性分析还可与核磁共振等其他分析技术相结合，更可靠地对可以鉴别药物、杂质或外源性污染物、极性大分子化合物等进行鉴别。非法添加物。产物离子扫描可以用于极性的大分子化合物的鉴别。复杂供试样品中待测成分的鉴定，应采用色谱-质谱联用仪或串联质谱仪。

质谱中不同质荷比离子的存在及其响应强度信息反映了待测化合物成分的结构特征，结合串联质谱分析结果，可以推测或确证待测化合物成分的分子结构。当采用电子轰击离子源化时，可以通过比对待测化合物成分的质谱图标准谱库谱图的一致性，快速鉴定化合物待测成分。对于未知化合物成分的结构解析，常通常需要综合应用各多种质谱技术并考虑样结合供试品的来源和特点等信息，必要时还应结合元素分析、光谱分析（如核磁共振、红外光谱、紫外光谱、X 射线衍射）的结果综合判断。

2. 定量分析

采用选择离子监测（selected-ion monitoring, SIM）或、选择反应监测或多反应监测，外标法或内标法定量。内标化合物可以是待测化合物成分的结构类似物或其稳定同位素（如 2H , ^{13}C , ^{15}N ）标记物。质谱定量分析一般需要使用每种待测成分的标准样品。通过比较待测样品与采用相同方法制备、浓度适宜的标准样品中的待测成分的峰面积等质谱响应参数，实现定量分析。

为实现对待测成分和内标物色谱峰面积的准确积分，采集速率、扫描范围或监测质量等采集参数的设置，必须保证在峰宽范围内提供足够数量的采集点数。采集点数与方法性能要求、色谱条件、质谱仪类型、监测的待测成分和内标物的数量有关。例如采用四极杆质谱仪进行单个待测成分的检测时，在整个分析过程中质谱仪在 SIM 或 SRM 模式下交替采集待

测成分和内标物色谱峰的数据。目前四极杆质谱仪每个采样点的停留时间可达 100ms 或更短，每个色谱峰上至少应有 8 个采集点数，以保证积分和定量准确。

~~分别配制一定浓度的供试品及杂质对照品溶液，色谱-质谱分析。若供试品溶液在特征 m/z 离子处的响应值（或响应值之和）小于杂质对照品溶液在相同特征 m/z 离子处的响应值（或响应值之和），则供试品所含杂质符合要求。~~

~~复杂样本中的有毒有害物质、非法添加物、微量药物及其代谢物的色谱-质谱分析，定量~~宜采用标准曲线法。通过测定相同体积的系列标准溶液在特征 m/z 离子处的响应值，获得标准曲线及回归方程。按规定制备待测样供试品溶液，测定其在特征 m/z 离子处的响应值，带入标准曲线或回归方程计算，得到待测成分物的浓度。~~定量分析复杂基质中药物及其代谢物、内源性代谢物和蛋白质时，通常采用内标校正的标准曲线法。~~内标校正的标准曲线法是将等量的内标加入系列标准溶液中，测定待测物成分与内标物在各自特征 m/z 离子处的响应值，以响应值的比值为纵坐标，待测物成分浓度为横坐标绘制标准曲线，计算回归方程。使用稳定同位素标记物作为内标时，可以获得更好的分析精密度和准确度。