

傅里叶变换-离子回旋共振质谱

王光辉 熊少祥

(中国科学院化学研究所北京质谱中心 北京 100080)

何美玉

王洪奇

(北京大学化学与分子工程学院 北京 100871) (布鲁克仪器有限公司 北京 100081)

摘要 本文介绍了傅里叶变换-离子回旋共振质谱 (FT-ICRMS) 的基本原理、发展历史、仪器特点。与其它类型质谱相比较, FT-ICRMS 具有超高质谱分辨率、高质量测量准确度、回旋池内现场反应等显著优点, 有望在多种学科的研究中得到更广泛的应用。

关键词 傅里叶变换离子回旋共振质谱 电喷雾电离 基质辅助激光解吸电离

1 发展历史

早在 1950 年前后, 就出现了具有实用意义的离子回旋共振质谱仪 (Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer, ICRMS), 主要用于物理化学的研究。在这之后的 20 多年中, ICRMS 不断获得改进。到 1974 年, Marshall 和 Comisarow 首次把傅里叶变换 (Fourier Transform, FT) 技术应用于 ICRMS, 使这类仪器的性能取得了一次重大的飞跃。5 年之后, 即 1979 年, 它已能轻易地达到 50 万的分辨率, 而且可以在少于 1 秒的时间内获得一张高分辨率的全谱, 因而可以和气相色谱联用。1980 年是 FT-ICRMS 发展历史的另一个里程碑, 从这 1 年开始, FT-ICRMS 采用了超导磁体, 显著地改善了仪器的分辨率和稳定性, 大大提高了质量测量的准确度和分析结果的重复性, 同时也扩展了仪器的质量范围。为了能够和新发展的各种电离方法, 如快原子轰击电离方法联用, 因此开展了将离子源移到离子回旋共振池之外的研究, 目的是保证离子回旋共振池的超高真空。然而当离子由外离子源飞向离子回旋共振池时, 离子会被超导磁体的边沿磁场反射, 进入池子的离子大为减少。1983 年解决了这一困难, 成功地把离子注入池子。从此, FT-ICRMS 由传统的气相离子化学的基础性研究领域, 跨入有机物及生物分子的结构分析领域, 成为强有力的分析手段。电喷雾电离 (ESI) 技术于 1988 年问世, 它在分析极性分子, 尤其是生物大分子方面具有突出的特点。第二年, ESI 就成功地与 FT-I-

CRMS 联用, 并在蛋白质的分析取得了十分引人注目的结果。FT-ICRMS 可以将脉冲式的离子流捕陷于回旋共振池中并加以分析, 因此它可以与基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 技术联用。目前已经问世的各种电离技术均可与 FT-ICRMS 联用, 这是其它类型质谱所办不到的。

FT-ICRMS 自诞生至今已有近半个世纪的发展历史, 可以说它已经进入了成熟期, 而且是正处在旺盛的发展时期, 已有多篇综述对 FT-ICRMS 作了详尽的评论和展望其发展前景^[1,2]。FT-ICRMS 的独特工作原理使它具有非凡的性能, 因而近几年来受到人们极大的关注, 无论在仪器的技术方面, 或者是应用研究方面, 均取得十分迅速的发展。

2 工作原理

ICRMS 的核心是一个处在高磁场的大约 5 厘米见方 (也可以是其它形状) 的分析池, 它是由一对激发电极, 一对检测电极和一对捕陷电极构成 (图 1a), 磁场垂直于捕陷电极。

若捕陷电极处在正电位, 则由于电场 (静电排斥力) 和磁场 (洛伦兹力) 的作用, 可以把正离子捕陷于池中。因为离子有热运动, 因此池中离子实际上是以磁场为轴心作半径很小的回旋运动, 各自的回旋运动频率为:

$$f = qB/2\pi m \quad (1)$$

式中 f 为离子回旋运动的频率, B 为磁场强度, q 为离子的电量, m 为离子的质量。若在激发电极上加一高频电信号, 其频率与某一个质荷比离子的回旋运动频率一致, 则这些离子会吸收

高频电信号的能量，因而其回旋运动半径逐渐加大。停止高频激发电信号后，这些离子将以较大的固定半径作运动，而且是处于相同位相。此时，由于这些离子离检测电极较近，因而检测电

极被感应而产生高频电信号（图 1b），其频率和该离子的回旋运动频率一致。根据公式（1），可由此频率算出该离子的质量（图 2）。

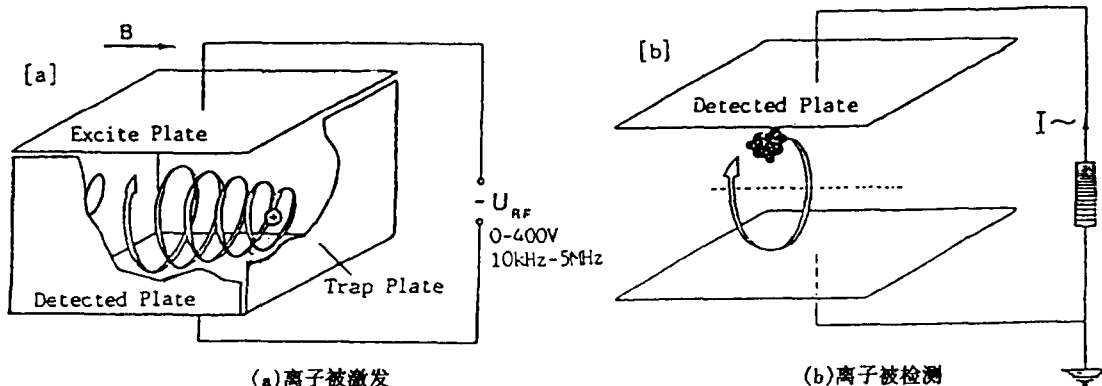


图 1 FT-ICRMS 工作原理

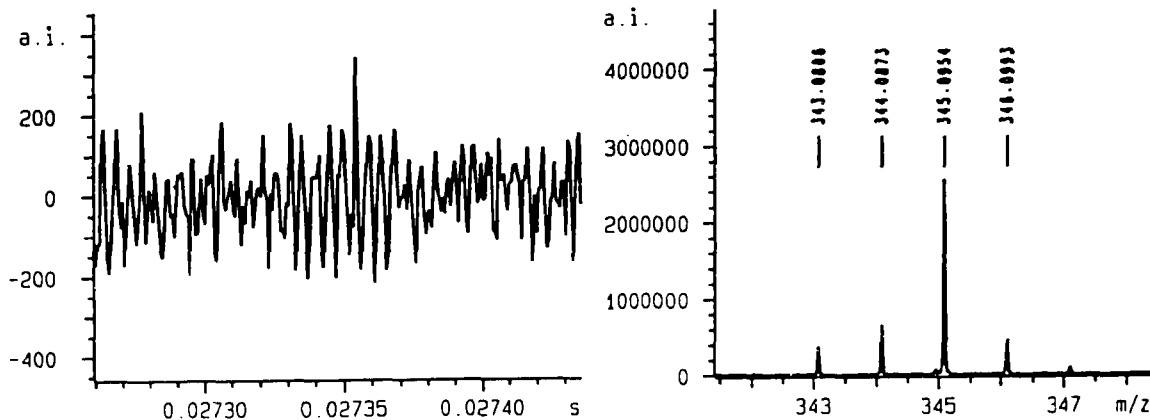


图 2 由检测到的高频信号变换为质谱图

FT-ICRMS 是用特定波形的高频电场，把共振池中某段质量范围内的离子同时激发到半径较大的回旋运动轨道上，这些离子以各自回旋频率作运动，因此在检测电极上感应出多种频率叠加的电信号。用傅里叶变换可以解出各个频率电信号的强度。根据公式（1）可以从频率换算成质量数，从而获得各个离子的质量及其丰度，即得到一张质谱图。FT-ICRMS 无需把不同质荷比的离子分离开，而是在同一时间内同时测量所有离子的质荷比及其丰度，因此全部离子得到最充分的利用。扇形磁场以及四极杆质谱仪是属于扫描型仪器，即把离子按不同质荷比分离开，并用扫描方式逐个测量不同质荷比离子的丰度。因此，在测量某个离子的丰度时，其余离子是损失掉的，即离子的利用率很低。由于分析过程的这

种根本性差别，因此可以期望 FT-ICRMS 能够比扫描型质谱仪达到更高的灵敏度。

3 FT-ICRMS 特点

3.1 超高质谱分辨率

FT-ICRMS 容易获得超高分辨率，而且由低分辨率转到高分辨率时可以不损失灵敏度。分辨率以及高分辨率时的灵敏度是质谱仪的重要性能，因为这些性能影响测定离子质量的准确度。离子的质量测得超准确，则由该离子的质量计算其 C、H、O、N 等元素组成时，给出可能的化学式越少，因而更加有利于确定未知物结构。目前只有两种高分辨率质谱仪达到实用阶段，即扇形磁场质谱仪以及 FT-ICRMS。扇形磁场质谱仪要获得高分辨率，必须减少离子通道中入口和出口

狭缝,因此它是以牺牲灵敏度来获得高分辨率。扇形磁场质谱仪的分辨率由 1000 提高到 10000 时其灵敏度要下降一个数量级。FT-ICRMS 的工作原理则完全不同,要提高其分辨率,只需加长采集离子信号(即检测电极上的高频电信号)的时间,因此对灵敏度没有明显的影响。例如,对于 $C_2H_4^+$ 和 N_2^+ 离子,当电信号的采集时间 $t = 25.6\text{msec}$ 时,分辨率为 3900,而当 $t = 102.4\text{msec}$ 时,分辨率可达到 18600。

FT-ICRMS 比扇形磁场质谱仪能够达到高得多的分辨率。据报道,用 FT-ICRMS 分析 H_2O , 可以达到 2 亿的分辨率。ESI-FT-ICRMS 商品仪器对于质荷比高达 5000 的离子也能轻易地获得数万的高分辨率,而且在分辨率为 1~2 万时,FT-ICRMS 的灵敏度比扇形磁场质谱仪高 2~3 个数量级。在 ESI 质谱分析中,高分辨率有着新的重要意义:在分析多肽、蛋白质等大分子时,ESI 能产生多电荷离子,在进行正离子分析的情况下,化合物分子可以分别结合不同数目的质子,因而在质谱图上显示出一组电荷数不同的多电荷离子峰;例如多肽 Ubiquitin 的 ESI 质谱图,呈现了 13, 12, 11, 10... 个电荷的一组多电荷离子峰(图 3)。

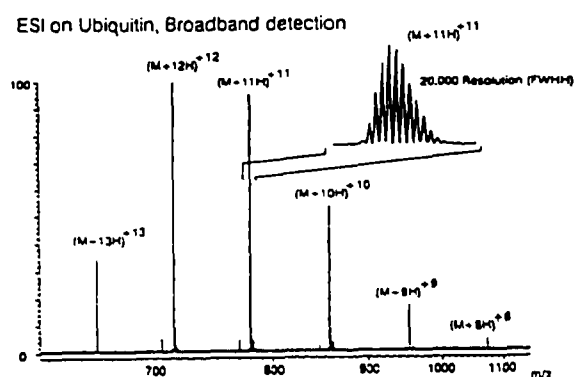


图 3 多肽 Ubiquitin 的高分辨 ESI 质谱图

在低分辨率分析时,由于不能把同位素分开,因此对应于某个电荷数(比如 12 个电荷)的离子只呈现单一的峰,质谱分析只给出此峰的质荷比数值,因而从单一峰是无法确定该离子的电荷数以及质量数,必须用同一个化合物的一组不同电荷数(比如 11 个电荷和 12 个电荷)的质谱峰才能解出离子的电荷数和质量数。倘若有杂质干扰,或者样品是多组分混合物,则用这种方法,有时会把不同化合物的峰错认为同一化合物

的峰,因而导致错误的计算结果。在实际的样品分析时,已经有过这种错误的实例。然而,若采用高分辨分析,则能够把同位素峰完全分开,对应于某个电荷数的离子,呈现一组多电荷离子的同位素峰(图 3 中插图),这些同位素峰之间的质荷比之差的倒数即为这组同位素离子的电荷数。例如,当相邻的两个同位素峰的质荷比相差 0.1,则这组离子为 10 个电荷的离子。求得电荷数之后,就可以由质荷比进而求出离子的质量。这个方法十分简单而且可靠,不受杂质的干扰,可以分析多组分混合物,尤其是可以分析多电荷离子经过碰撞诱导分解后的产物,这是许许多多不同质量数、不同电荷数离子的十分复杂的质谱图,用低分辨质谱仪往往是无法分析的。由此可见,在高分辨时具有高灵敏度的质谱仪更能充分发挥 ESI 的特点,获得更为可靠的数据。目前 ESI 和 FT-ICRMS 联用被认为是最佳的组合,它能轻易地达到 ppm 水平的质量测量准确度。最新的报道,用毛细管电泳和 ESI/FT-ICRMS 联用,分析红血球细胞中血红蛋白的 α 和 β 链,得到分辨率高达 45000 的质谱图,而所需样品仅为 10 个红血球细胞,相当于 $4.5\text{fmol}^{[4]}$ 。

3.2 高质量测量准确度

FT-ICRMS 无需内标物即可达到 3~4ppm 的质量测量准确度,如果使用内标物,则准确度可以进一步改善,达到优于 1ppm 的水平。用 FT-ICRMS 分析样品时,直接测量的量是离子的回旋运动频率,然后由频率和磁场换算成质量数(公式 1)。频率是一个容易准确测量的量,而超导磁体产生的磁场又极为稳定,因此只要保持分析池的超高真空,同时适当控制池中离子的数目,那么即使不用内标物,FT-ICRMS 也可以十分准确地确定离子的质量。已经系统地研究了影响质量测量准确度的各种因素,并在此基础上建立起完善的校正方法,不仅在个别的 FT-ICRMS 实验室能够达到极高的质量测量准确度,不用内标物,也能保证达到 3~4ppm 的质量测量准确度,给高分辨质谱分析带来极大的方便。

用扇形磁场质谱仪准确测量离子的质量时,由于仪器的稳定性、重复性以及离子源状态等诸多因素的影响,必须使用内标物才能达到有实用意义的质量测量准确度。使用内标物给操作带来不少困难,尤其是进行全谱高分辨分析的操作

(即测量全部离子的准确质量), 因为必须控制样品和内标物达到合适的比例时, 才能获得较好的质量测量准确度。再者, 扇形磁场质谱仪的灵敏度是随分辨率的提高而急剧下降, 这也是用这类仪器准确测量离子质量的根本性困难。扇形磁场质谱仪在分辨率为 10000, 进行全谱高分辨率分析时, 对于强度较高的样品离子, 质量测量准确度大致在 10ppm 左右。此外使用软电离技术分析生物大分子, 如多肽、蛋白质时, 往往难于找到与样品的分子量相近的一对内标物, 这也给扇形磁场质谱仪准确测量质量带来困难。

3.3 可以进行多级质谱分析

质谱仪可以作为一种分离效率极高的分离手段, 基于这种考虑, 在 70 年代末, Yost 提出了串联质谱分析技术, 即把两台质谱仪的头和尾彼此串联起来, 并在两台仪器中间安置了一个碰撞区; 用第一台质谱仪作为分离手段, 选出要研究的离子, 送入碰撞区, 使它与惰性气体碰撞而分解(此过程称为碰撞诱导解离 CID), 然后用第二台质谱仪分析所生成的碎片离子, 获得质谱图, 它包含着该离子的结构信息。这种串联质谱仪属于“空间串联”方式, 显然, 从灵敏度以及仪器的造价等方面考虑, 采用这种串联方式把两台以上质谱仪连接起来是不实际的。用两台高分辨率扇形磁场质谱仪串联起来, 可以进行两级高分辨率质谱-质谱分析, 这种仪器造价十分昂贵(100 多万美元), 而且由于碰撞时不可避免地发生离子的散射, 造成碎片离子损失很大, 因而灵敏度很低, 总的 CID 效率低于 5%。于是有人提出, 花费这么高的代价来获得很有限的信息是否值得?

FT-ICRMS 是以“时间串联”方式工作的, 它是用同一台仪器, 按时间先后, 顺序完成质谱-质谱分析的各个步骤, 即用激发脉冲把要研究的离子之外的其余所有离子都赶走, 因而池中只留下要研究的离子, 然后将其激发到较大的回旋运动轨道并使它与惰性气体碰撞, 因为池子是处在高磁场中, 因而产生的碎片离子几乎全部被陷于池中, 接着再分析这些碎片离子。由于全部过程都在同一个池中进行, 离子损失很少, 因此有极高的灵敏度。原则上可以重复以上过程, 实现高于二级的多级质谱分析, 而且由于 FT-ICRMS 固有的高分辨率、高灵敏度的特点, 因此

可以实现每一级都是高分辨率质谱分析并得到所有离子的准确质量。离子在池中作回旋运动的动能不高, 因此发生的碰撞属于低能碰撞, 对于大分子往往不易将其碰碎。为了能更有效地提高生物大分子离子的内能, 以得到更丰富的碎片离子, 已研究了多种激发离子的方法, 如 SORI、MECAD 等, 可以使离子发生多次碰撞, 从而发生多次能级跃迁而达到较高的内能。

用串联质谱仪可以直接分析混合物, 例如把少量的植物组织干粉末直接放入离子源中并将其加热, 蒸发出来的样品蒸气被电离后, 如果存在 $m/z303$ 离子(古柯碱的分子量为 303), 则用第一级质谱将它选出, 经碰撞后, 用第二级质谱分析其碎片离子, 得到其质谱图。如果得到的质谱图与古柯碱的 CID 谱一致, 则说明该植物组织中含有古柯碱。该方法省去了样品的提取、纯化等步骤, 因而十分快速、简便。多级串联质谱仪可以用来确定离子碎裂过程中, 各个离子的亲缘关系, 这些信息对于推断复杂未知物的结构是十分有益的。此外, 软电离技术虽然能得到很强的准分子离子峰, 但往往缺少碎片离子, 即结构信息量少, 因此难于推导样品分子的结构。用串联质谱技术与软电离技术联用, 则可以弥补这种不足。串联质谱仪还常用于研究离子的结构。由于 FT-ICRMS 在高分辨率时具有高灵敏度的特点, 因此它在上述种种分析中显示出十分突出的优点。

3.4 回旋池内现场反应

FT-ICRMS 可将离子长时间地捕陷于池中, 并对其进一步加工处理。曾报道, 把一个电子捕陷于 ICRMS 池中长达 10 个月之久! 把一个样品捕陷于池中数小时, 对于超导磁体 FT-ICRMS 商品仪器, 已经是一种常规的操作。由于 ICRMS 的这一特点, 因此自它诞生之日起, 它一直被用于离子的结构以及离子-分子反应的研究。这些研究并不完全限于纯理论性的, 近年来已出现了以分析应用为目标的研究。用 FT-ICRMS, 可以对被捕陷于池中的离子, 进行以下各种加工:

(a) 离子-分子反应。由于离子可以在回旋池中停留很长时间, 因此可以研究的反应类型比较广。已提出, 把多肽离子捕陷于池中, 使它与反应试剂在池中反应, 将其降解, 然后分析降解产物, 以取得氨基酸序列信息。用化学降解代替

碰撞解离的好处, 在于化学降解能专一性地切断特定类型的化学键, 因而产物离子的质谱图能得到比较明确的解释, 而碰撞法则可以发生较多类型的键断裂, 给谱图解释带来困难。最近取得了一个引人注目的成果是: 用离子-分子反应来探测蛋白质分子的构象^[5], 即把由 ESI 产生的蛋白质多电荷离子捕陷于池中, 使它与 D₂O 发生 H/D 交换, 蛋白质的构象不同, 则暴露在外面的可交换的活泼氢的数目不同, 因此可根据 H/D 的交换速率以及平衡后的交换数目, 来区分蛋白质的不同构象。用这方法已证明细胞色素 C 在气相中至少存在三种稳定的构象。这个结论与用 NMR 研究的结果是一致的。用 FT-ICRMS 研究团簇 (如 C₆₀) 的反应性能则是另一个研究热点, 这些研究可能导致新型材料的出现, 也可为催化理论和新型催化剂的研制带来突破, 如最新发现的 Fe₄⁺ 团簇离子对 C₂H₄ 转变为 C₆H₆ 的催化作用。

(b) 光解反应。用激光照射束缚于池中的离子, 可方便、有效地研究光解反应, 尤其是多光子光解反应。利用光解反应可以取得十分有益的结构信息。

(c) 诱导光发射。离子经过适当地碰撞, 可以引起发光, 称为碰撞诱导光发射; 用激光照射离子, 也可引起离子发荧光, 称为激光诱导荧光

发射。诱导光发射是当前一个重要的研究前沿, FT-ICRMS 则是这一研究领域的重要手段。

离子的光解和光发射的研究, 有希望导致在一台 FT-ICRMS 中, 既得到质谱又得到光谱, 实现质谱与光谱的结合。

4 结束语

FT-ICRMS 近 10 年来的发展, 已充分地说明了它不仅是研究气相离子化学的十分有效手段, 而且已日渐在复杂有机物, 包括生物大分子的结构分析领域中占有突出地位。近几年来发表的有关 FT-ICRMS 研究的报告, 正急剧上升。可以预言, 在不久的将来, FT-ICRMS 会成为主要使用的高分辨质谱, 尤其是在生物质谱实验室。

参考文献

1. Buchanan M. V., Hettich R. L. *Anal. Chem.* 1993, 65: 249A-259A
2. Marshall A. G., Schweikhard L. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1992, 118/119: 37 ~ 70
3. Deborah Noble *Anal. Chem.* 1994, 66: 660A-661A
4. Hofstadler S. A., Swanek F. D., Gale D. C., Ewing A. G., Smith R. D. *Anal. Chem.* 1995, 67: 1477 ~ 1480
5. Beu S. C., Senko M. W., Quinn J. P., Wampler F. M., McLafferty F. W. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993, 4: 557 ~ 565

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry

Wang Guanhui Xiong Shaoxiang

(Beijing Mass Spectrometry Center, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080)

He Meiyu

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University Beijing 100871)

Wang Hongqi

(Bruker Instrument, Ltd Beijing 100081)

Abstract In this paper the basic principle, developmental history and instrumental characteristics of fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICRMS) were introduced. Compared with other mass spectrometers, FT-ICRMS has shown more powerful performances such as high resolution, high measurement accuracy and in situ reaction in cell, which allow its application more widely in scientific research.

Key words Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry Electrospray ionization Matrix assisted laser desorption ionization