[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
H01J 49/04

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 98803342.9

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1127118C

[22] 申请日 1998.3.11 [21] 申请号 98803342.9

[30] 优先权

[32] 1997. 3.14 [33] US [31] 60/040,716

[32] 1998. 3.11 [33] US [31] 09/038,017

[86] 国际申请 PCT/US98/04678 1998.3.11

[87] 国际公布 WO98/42006 英 1998.9.24

[85] 进入国家阶段日期 1999.9.14

[71] 专利权人 乔治华盛顿大学

地址 美国华盛顿

[72] 发明人 弗雷德·P·艾布拉姆森

审查员 郭永菊

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司

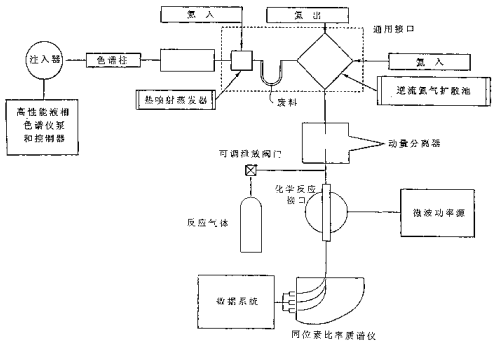
代理人 刘国平

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 5 页

[54] 发明名称 一种用氟基化学反应连续测定同位素比率的装置和方法

[57] 摘要

一种测定含碳或氮化合物的样品中的同位素比率的质谱仪或方法，作法是把含有碳或氮的样品加入到一个样品导入部件中，其中被分析物的混合物是分离成为分子状的。 样品被连续地导入到一个化学反应接口，把原封未动的碳和氮分析物转化成含氟的化合物。



ISSN1008-4274

1.一种通过连续有序的流程，把每一种元素在含氟的环境中变成新的化学物质，以探测样品中各元素的同位素比率的质谱仪装置，它包括：

(a) 一个样品导入部件，它把被分析物的混合物分解为特定的分子，其中所述的样品导入部件包括用于将样品连续地导入到化学反应接口的设备；

(b) 一个化学反应接口，其中所述的化学反应接口用于将完整的分析物在含氟的环境中转变成新的特定元素的化合物；以及

(c) 一个可以精确测量同位素的质谱仪。

2.如权利要求1所述的装置，其中所述的样品导入部件选自由气相色谱仪和高性能液相色谱仪所组成的组中。

3.如权利要求1所述的装置，其中所述的化学反应接口是一个微波功率源氦等离子体接口。

4.如权利要求1所述的装置，其中所述的质谱仪是一个多路收集的同位素比率质谱仪；

5.如权利要求2所述的装置，其中所述的样品导入部件为高性能液相色谱仪，它采用雾化和逆流来移动液相通过通用接口。

6.如权利要求2所述的装置，其中所述的样品导入部件为高性能液相色谱仪并用传输装置移动液相。

7.一种用于测量含有碳，氮，氢，氧，氯和硫化合物的样品质量的方法，它包括：

(a) 将含碳或氮化合物的样品加进样品导入部件，在该部件中分析物的混合物被分解为特定的分子，其中所述的样品导入部件包括用于连续地将样品导入到化学反应接口的设备；其中所述的化学反应接口将完整的含碳和氮的分析物在含氟的环境中转变成新的特定元素的化合物；以解析所述的化合物；以及

(b) 用可以对同位素进行精确测量的质谱仪计算所述样品的化合物的同位素比率。

8. 如权利要求7所述的方法，其中所述的质谱仪选自由化学反应接口质谱仪和同位素比率质谱仪所组成的组中。

9. 如权利要求7所述的方法，其中所述的含氟的反应气体是NF_3。

10. 权利要求7所述的方法，其中所述的含氟的反应气体是F_2。

11. 如权利要求7所述的方法，其中所述的样品还包括含有选自由碳，氮，重氢，氯，氧和硫所组成的组中的至少一种元素的化合物。

12. 如权利要求11所述的方法，其中所述的样品包括含有碳和氮的化合物。

13. 一种估计未知药物或生化代谢物中的元素或同位素特性的方法，包括如下步骤：

(a) 将含碳和/或氮的未知药物或生化代谢物的样品添加到样品导入部件中，分析物的混合物在该部件中被分解为特定的分子，所述的样品导入部件包括用于连续地将样品导入到化学反应接口的设备；其中所述的化学反应接口将完整的含碳和/或氮的分析物在含氟的环境中转变成新的特定元素的化合物；以解析所述的化合物；以及

(b) 用可以对同位素进行精确测量的质谱仪计算所述样品的化合物的同位素比率。

14.如权利要求13所述的方法，其中所述的未知药物或生化代谢物的样品含有选自由碳，氮，重氢，氯，氧和硫所组成的组中的至少一种元素。

15.如权利要求13所述的方法，其中所述的方法还包括通过在未知药物或生化代谢物中加入可以由气相色谱仪/化学反应接口质谱仪探测的硫、磷或硫醚键来对该未知药物或生化代谢物样品进行化学改性。

16.如权利要求13所述的方法，其中所述的方法是用一个装置实现的，该装置包括：

(a) 一个样品导入部件，它把被分析物的混合物分解为特定的分子，其中所述的样品导入部件包括用于将样品连续地导入到化学反应接口的设备；

(b) 一个化学反应接口，其中所述的化学反应接口用于将完整的分析物在含氟的环境中转变成新的特定元素的化合物；以及

(c) 一个可以精确测量同位素的质谱仪。

一种用氟基化学反应连续测定同位素比率的装置和方法

技术领域

本发明涉及一种用来测定含有碳或氮的化合物以及含有氢、氧和硫同位素的化合物试样的同位素比率的装置和方法。

背景技术

质谱测量装置已是现有技术。例如，美国专利 5,468,452 号公开了一种把高性能液相色谱仪和质谱法结合起来的定量分析方法。

根据该发明，有机化合物的定量分析是用一种高性能液相色谱仪来完成的，用一个大气压化学电离接口将该色谱仪与质谱仪相连接，化学电离接口包含有一个电离室，该电离室有一个用银或铂合金，不锈钢或镀锡的或未电镀的铁做成的电晕放电极。但是，哈吉瓦拉（Hagiwara）并没有公开包括氟在内的反应气体的使用情况。

美国专利 4,933,548 号披露了一种把试样导入质谱仪的方法和装置。博耶（Boyer）等人披露了一种把微试样导入质谱仪的离子源中的技术和装置，质谱仪加热微试样并输送一个可调节的试剂流，把微试样转化为气相化合物。该披露的系统基本上用作化学反应接口（CRI）。反应气体可以包括氟。当温度上升到超过金属氧化物的升华点并达到六氟化物(hexafluorine)的升华点时，输送质谱仪的离子源 18 的阀门就被打开，开始输送离子源。同位素比率的测量结果可以与导入该质谱仪的标准铀，六氟化物的测量结果相比。但是，博耶（Boyer）并没有披露微试样的加热方法，因而，也没有提供关于连续试样流的任何教导。而且，博耶（Boyer）并没有利用同位素比率质谱仪 IRMS（Isotope-Ratio Mass Spectrometer），因而无法知道该发明所得结果的质量。

美国专利 4,633,082 号披露了测定硫六氟化物高压系统中的降解方法。索尔斯(Sauers)披露了用氟作为载体气体。

美国专利 5,086,225 号公开了一种同位素纯化用的热循环的循环泵。

桑（Song）和艾布拉姆森（Abramson）在美国质谱学会学报，1995 年第 6 期，421-427 页（J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1995，No. 6，p, 421-427）中，描述了把硫的三氟化物作为探测磷，重氢，氯和硫的化学反应接口质谱术中新的反应气体。该篇论文未披露或建议使用氟气体来获得含碳试样和氮试样之间的质谱仪分辨率。

在技术上有必要使质谱仪和检验器更灵敏，以提供质谱仪对碳和氮化合物之间的分辨率。当像大多数质谱仪那样做质谱测定时，在有氧的情况下，含碳和氮化合物的质量会在 28，29 m/z（质量/离子所带电荷的单位数）左右互相重叠。本发明通过应用氟气以把重叠的信号分开的方法，克服了现有装置和方法的缺陷。

本发明的公开

本发明提供一种质谱仪装置，可用一种连续有序的方法，灵敏地探测试样中各元素的同位素比率，这种方法是在含氟的环境中，把每一种元素转变成新的化学物质，它包括：

(a) 一个样品导入部件，它把被分析物的混合物分解为特定的分子，其中所述的样品导入部件包括用于将样品连续地导入到化学反应接口的设备；

(b) 一个化学反应接口，其中所述的化学反应接口用于将完整的分析物在含氟的环境中转变成新的特定元素的化合物；以及

(c) 一个可以精确测量同位素的质谱仪。试样导入部件最好是气相色谱仪或高性能液相色谱仪。化学反应接口最好是微波功率源氦等离子体接口，质谱仪是一个多路收集的同位素比率质谱仪。

在一个最佳实施例中，试样导入部件是一个高性能液相色谱仪，其中用雾化和逆流来移动一个液相通过一个通用接口。在另外一个实施例中，试样导入部件是一个高性能液相色谱仪，并且用一个传输装置移动（remove）液相。

在另一个实施例中，本发明有利地提供了一种测量含有碳和氮化合物的试

样质量的方法，它包括：

(a) 将含碳或氮化合物的样品加进样品导入部件，在该部件中分析物的混合物被分解为特定的分子，其中所述的样品导入部件包括用于连续地将样品导入到化学反应接口的设备；其中所述的化学反应接口将完整的含碳和氮的分析物在含氟的环境中转变成新的特定元素的化合物；以解析所述的化合物；以及

(b) 用可以对同位素进行精确测量的质谱仪计算所述样品的化合物的同位素比率。

在一个最佳实施例中，所用的质谱仪是一个化学反应接口质谱仪(CRIMS)，或是一个同位素比率质谱仪系统(IRMS)。在一个最佳实施例中，含氟的反应气体是 NF_3 或是 F_2。在另一个实施例中，被检测的试样还包括一种含氧，磷，重氢，氯或硫的化合物。

通过下文的详细说明和附图，熟悉本技术领域的人员可以清楚地看到本发明的上述目的和其它他的目的，下面仅就实施本发明的最佳模式加以描述，并给出附图。众所周知，在本发明的相关技术内可对本发明作修改，都离不开本发明的方案范围。

附图的简要说明

图 1 是本发明的一个最佳实施例中的色谱法/质谱测定法装置的方框图。

图 2 是用维斯特克（Vestec）通用接口作高性能液相色谱仪（HPLC）导入用的化学反应接口-质谱仪（CRI-MS）探针的示意图。

图 3 是仪器总方框图。

图 4(a)-(c)表示采用 NF_3 为反应气体，试样 G40 的高性能液相色谱仪/化学反应接口质谱仪（HPLC/CRIMS）色谱图。图 4(a)表示对碳的探测，图 4(b)表示对硫的探测，图 4(c)表示对氯的探测。

本发明的详细描述

本发明涉及用氟基化学，在连续流分析中，对包含在不同试样中的碳和氮

元素，产生出氟的衍生物。采用氟，就可以用一个同位素比率质谱仪(IRMS)取得较好的和更加灵活的同位素丰度测量值。

添加氟基反应气体，可使某个给定的分析物中原来含有的碳和氮元素完全化学变化成新的分子，在此过程中，是由于元素或同位素成分的最初的氟化作用，而不是氧化或还原作用，形成新的分子。

氟或氟基化学的优点如下：

(1) 氟只有单个同位素(^{19}F=100%)，而氧的同位素分布是 ^{16}O=99.76%, ^{17}O=0.04%；以及 ^{18}O=0.2%。用连续流同位素比率质谱仪(CF)-IRMS 作为最普通的测量是测量 ^{13}C，所测的物质是 CO_2。在离子重量为 45 质量单位的测量通道中，不仅包括了想要的物质 $^{13}C^{16}O^{16}O$,也还包括 $^{12}C^{16}O^{17}O$, 这样就必须进行修正。相反，氟的产物 $^{13}CF_4$，可以直接测量。

(2) 在质谱仪中，CO_2 分裂，会产生 CO，它是一种质量为 28 质量单位的物质，和 N_2 的质量相同。因此，如果要测量 N_2 的同位素比率，则在进入同位素比率质谱仪系统之前，必须截留 CO_2。这意味着人们不能用同一个实验装置来同时测量 ^{13}C 和 ^{15}N 的浓度。生产 CF_4，而不是 CO_2，就没有这个问题。

(3) 分析氢的同位素，传统的方法需要在化学和分析两方面作完全的改变。采用的是还原方法，而不是氧化方法，产物是 H_2。感兴趣的质量数是 2($^1H^1H$)和 3($^1H^2H$)。用这些低质量成分，需要用与 N_2(28 和 29)或 CO_2(44，45，和 46)不同设计的分析器。而采用氟基化学，HF 在质量 20 或 21 上测得，可以采用标准的分析器的结构。

(4) 当分析 H_2 时，会有一个反应 $H_2^+ + H_2 - H_3^+ + H$。H_3^+ 导致质量数为 3 的一个信号质量，它与 $^1H^2H$ 的质量相一致。这就限制了测量 ^2H 的精度和准度。

(5) 另外两个元素的同位素成分可以用同样的化学方法来检测，即 S 和 O。因此，用氟基化学方法测量和分辨碳和氮化合物，要比用以前的方法更全面。

一个连续流同位素比率质谱仪（CF-IRMS），可以用于测量含碳和氮

化合物的试样的同位素比率。

连续流同位素比率质谱仪（CF-IRMS），可用于基础和临床的医学地质化学，植物生理学，食物和调味剂，以及海洋学。这个课题最近被评论过(质谱学学报，1996 年，31 卷，第 225 至 235 页，W. Brand, J. Mass Spectrom, Vol. 31, PP. 225-235,1996)。

在图 1 中，试样是用一个高性能液相色谱仪 (HPLC)导入的。各个成分在一个色谱柱里分离开，然后通过一个（任选的）紫外线探测器，这是一个标准的高性能液相色谱仪系统。试样在其中游移的液体流在通用接口(UI)中被汽化，“干的”粒子通过一个动量分离器（momentum separator），其中很强的氦气流被降低到很小，以适合于进入化学反应接口，然后进入质谱仪。在化学反应接口中，所有化学物质由一个微波感应引起的氦等离子体分解成它们的元素，氦等离子体被保持在一个铝管中，该管通过一个聚焦微波能的腔。在等离子体中释出来的元素重新结合形成一组较小分子的产物，其性质取决于被分析物的成分和用什么样的反应气体。

如果用气相色谱导入，从色谱柱出来的输出直接进入化学反应接口。在这种形式装置中没有使用从动量分离器到高性能液相色谱仪的仪器设备。

当反应气体包括氟时，至今还只是用了 NF_3，产生唯一的一组小分子产物，它们在同位素质谱仪中具有特殊的用途。

含氟的一组新的反应，在化学反应接口质谱仪中作了研究。这种富含氟的环境为有选择地和同时地探测氧，碳，氮，磷，氢同位素，氯和硫提拱了新的途径。

作为一种反应气体，NF3 为化学反应接口质谱仪（CRIMS）提供了最为完善的探测元素和同位素的方法。化学反应接口质谱仪（CRIMS）是一种将有选择地探测元素和它们的同位素与传统的质谱测定法结合在一个单一系统中的一种技术。对于现有的质谱测定系统作很少的修改，化学反应接口质谱仪（CRIMS）就已经显示出能够有选择地探测元素和同位素，包括 2H, 13C, 14C, 15N, S, Cl, Se, O 和 Br。它在不用放射性标记研究新陈代谢时是特别有用的，甚至在没有稳定的同位素标记时，只要分子具有“固有的标记”，例如 Cl 和 S

也能行。

包含碳和氮的化合物在生物化学，医学和环境科学方面是非常重要的。由于其它方法的使用，短缺和局限性，这一战略性的发展使得能够用化学反应接口质谱仪（CRIMS）和同位素比率质谱仪（IRMS）系统对含 C, N, 和 P 的化合物作选择性的探测。

实验

本发明的方法好在使用了一个高性能液相质谱仪（HPLC）和一个连续流同位素比率质谱仪。它包括：1. 一个高性能液相色谱仪（HPLC）；2. 一个维斯特克高性能液相色谱仪/质谱仪（Vestec HPLC/MS）接口；3. 一个化学反应接口（CRI）；和 4. 一个同位素比率质谱仪（IRMS）系统。

化学反应接口质谱仪（CRIMS）采用毛细管气相色谱法与传统的质谱仪相结合化学反应接口-质谱仪（CRI-MS）提供了广泛的应用范围；而且，高性能液相色谱仪（HPLC）的化学反应接口（CRI）的最新发展与传统的的燃烧方法相比，这种化学反应接口（CRI）的独特的化学方法改进了 15N 的探测。这种仪器为那些利用同位素和同位素比率质谱仪（IRMS）的研究者提供了广泛的靶分子，包括原封未动的生物聚合物。与高性能液相色谱仪（HPLC）/传统的质谱仪（MS）相比，本发明可以对同位素丰度很低的 13C 和 15N 进行选择性探测。

另外，原封未动的生物大分子也可以直接用连续流-同位素比率质谱仪（CF-IRMS）作同位素定量分析。这就极大地改进了生物系统的分析，不管这种分析是把 14C 作为示踪剂，还是需要作一系列冗长乏味的水解分析之后对选出的要做色谱分离和质谱分析。

化学反应接口

在本发明的鉴定中，使用的最佳装置采用的是一种微波功率化学反应接口(CRI)。这个装置使被分析物分解，并把它们重新组合为小分子，这些分子的谱使得可以不受原分析物分子结构的影响，有选择的探测有机分子的稳定的同

位素；否则就要用放射性。化学反应接口（CRI）的大多数使用包括色谱分离和一个单路收集器探测快速扫描质谱仪（MS）。

同位素比率质谱仪

同位素比率质谱仪（IRMS）装的多级收集器，可以探测到比传统的质谱仪能探测到的低几个数量级的（同位素）丰度。

一个通用的高性能液相色谱仪/质谱仪（HPLC/MS）接口

一个通用的接口（universal interface, UI）基本上能够把高性能液相色谱仪（HPLC）溶剂从被分析的试样流中完全排除。它只允许从高性能液相色谱仪（HPLC）导入到化学反应接口（CRI），滞留下 1/100,000 的溶剂会淹没了它的化学药品，这就提高了同位素比率质谱仪（IRMS）中 CO2 的基线。通过与维斯特克（Vestec）公司（现在是 PerSeptive Biosystems 公司的分公司）的合作，发明者已经生产出一种化学反应接口-质谱仪（CRI-MS）仪器，它用高性能液相色谱仪（HPLC）来分离混合物，而不用以前所用的气相色谱法。

图 1 所示的装置先使氦流中的热喷雾化射出物成为非溶剂化物，然后用一个氦的逆流（V1）除去剩余的蒸汽。剩余的溶剂不到百万分之一或一亿分之一。再用动量分离器（见图 2）把氦的流量从每分钟几升(L/min)降至每分钟几毫升(mL/min)，试样流就成为一群特别“干”的氦(He)被分析物的粒子。與传送带不同，这种做法显得比别的高性能液相色谱仪/质谱仪（HPLC/MS）接口要好得多。通用的接口（UI）的出口流适合于导入化学反应接口（CRI），化学反应接口（CRI）通常与 1-2 毫升/分（mL/min）的 He 流中携载的被分析物一起运作。发明人至今已经产生了一个设计，能把高性能液相色谱仪（HPLC），通用的接口（UI），和化学反应接口（CRI）与磁扇形的质谱仪（MS），以及与常规的四极质谱仪（MS）和同位素比率质谱仪（IRMS）联用。

这种装置提供了一个新的分析概念，高性能液相色谱仪/化学反应接口-同位素比率质谱仪（HPLC/CRI-IRMS）对于诊断化验，特别是对于生物学和药物学具有特殊的重要性。像尿素，氨基酸这样简单的以及像 DNA 这样复杂的

化合物，其稳定同位素的探测，都可以用这种装置来做。

化学反应接口（CRI）为燃烧系统提供了另外一种做法，即为使用气相色谱导入试样的同位素比率质谱仪（IRMS）提供一个“标准”。 化学反应接口（CRI）的优点是：氧化气体基本上可以无限制地提供，而 CuO 燃烧室或其它化学反应器的供氧是有限的；对于氮的探测类似于 NO，这样就避免了 CO 和 N2 之间的干扰；可以改变化学以监测更广泛的同位素物质，例如 18O 或 34S。

高性能液相色谱仪（HPLC）在生物化学方面的越来越多的应用说明，高性能液相色谱仪/同位素比率质谱仪（HPLC/IRMS）仪器在帮助物质的新陈代谢研究方面是一大进步，这是气相色谱(GC)方法做不到的。要是超过了高性能液相色谱仪（HPLC）导入需要分离试样的能力，可对于预先纯化了的试样，用流注入器法（也就是由支柱直接导入到溶剂流），这样，化学反应接口（CRI）适用的物质范围就可大大地扩宽，特别是对原封未动的生物大分子。

该装置可以提供高精度的同位素测定，这会大大地减少对于大分子的分析时间，对大分子的测定现在不得不首先降解为单体（或小的齐聚物），然后进一步纯化、分离，和分析方能知道有多少特定的标记已经被包括。在气相色谱仪中经常用到的碳基衍生化操作的异常同位素性质的复杂性，在用高性能液相色谱仪（HPLC）所作的高精度同位素比率质谱仪（IRMS）测量中不再有了。

通常，人们在试验中比较喜欢用稳定同位素，因为它们没有放射性带来的风险。由于氮没有放射性，所以用 15N 作为示踪剂是特别重要的。与传统的质谱仪（MS）相比，同位素比率质谱仪（IRMS）提高了探测极限，这意味着更有条件完成人类的和别的示踪剂的试验。

生物学系统中同位素比率测量

生物系统中的同位素比率质谱分析产生于三十年代后期里腾伯格（Rtttenberg）的开拓性研究。一般而言，常常借助密封管内的燃烧，把恰当准备的试样离线转换为小的多原子物质，例如 CO2、N2 及 H2O。在受控条件下，该气体在长时间内被导入多级收集器中，以便精确地确定 45/44 比例[即

（13C16O2 + 12C17O16O）/12C16O2]。该方法将被称为“离线燃烧同位素比率质谱仪（IRMS）”。

特别适用的同位素比率质谱仪（IRMS）的情况起始于 1976 年。萨诺（Sano）等（S1）第一次描述了这样一种仪器，其中一个气相色谱仪（GC）、一个燃烧室及一个同位素比率质谱仪（IRMS）被耦接在一起。下一先例由马修斯（Matthews）及海斯（Hayes）（M3）提供。在不使用多级收集器同位素比率质谱仪（IRMS）的情况下，他们得到了 13C 及 15N 的高精度、低丰度检测。利用该方法，他们可从 9nmol 甲基辛酸盐中测量 0.02APE* 的 13C。

比较起来，离线燃烧技术比其后的双入口、双路收集器同位素比率质谱仪（IRMS）测量的精度要高 5 倍，但是产生该测量需要 230 毫微摩尔。马修斯（Matthews）及海斯（Hayes）报道该装置能够在含 10 毫微摩尔碳的试样中检测 0.2 微微摩尔超额 13C。对于氮，他们检测了血浆氨基酸，并得出结论在 10 毫微摩尔的氮中可确定 4 微微摩尔的超额 15N。

在 1984 年，巴里(Barrie)等（B1）利用非常类似于马修斯（Matthews）及海斯（Hayes）的燃烧接口，把气相色谱仪与多级收集器稳定的同位素比率质谱仪连接在一起。一般而言，他们的结果与双入口、双路收集器同位素比率质谱仪（IRMS）相似，误差为 2δ13C*•，即 0.2%的误差。作者得出结论：

“我们可期望气相色谱仪/稳定的同位素比率分析仪（SIRA)技术，将所需的标记化合物的量至少减少到原量的十分之一，并且允许在只能在标记化合物的浓度低到不能被气相色谱仪/质谱仪/选择的离子监视（GC/MS/SIM）利用的情况下，进行新的研究。”

具有两种可商业获得的气相色谱仪（GC）/燃烧/同位素比率质谱仪（IRMS）仪器；例如，遵循该设计策略的 Finnegan MAT Delta C，公布的数据表示该系统能够获得和离线燃烧同位素比率质谱仪（IRMS）分析可比的精度。

连续流动气相色谱仪（GC）/同位素比率测量的概念已被清楚定义及评价。当把气相色谱仪（GC）及燃烧室与在质量之间转换峰值，并利用电子倍增器

---

* 原子超额百分数是未知的同位素比率与标准的同位素比率之差乘以 100 再除以[1+IR(x)-IR(std)]。

• δ(每毫升)符号表示未知的与标准的同位素比率之间的相对差值：δ=[IR(x)-IR(std)]/IR(std)·1000。

检测的单级收集器质谱仪耦接时，可实现比简单的选择离子记录气相色谱仪/质谱仪（GC/MS）实验好得多的性能。当和具有多级法拉弟收集器的质谱仪耦接时，气相色谱仪（GC）/燃烧室/同位素比率质谱仪（IRMS）看起来产生几乎和离线燃烧同位素比率质谱仪（IRMS）方法同样好的结果，但是所需材料少得多。显然，借助在线气相色谱仪（GC）及燃烧室，不需要获得净化的试样，也不需要在同位素比率质谱仪（IRMS）测量之前对试样进行处理。

另一种同位素比率质谱仪（IRMS）技术是耦接元素分析仪、气相色谱仪（GC)及同位素比率质谱仪(IRMS)。这在 1985 年首先实现于 13C 及 15N(P2)。借助该组合，在固定气体燃烧产物 N2 及 CO2 流入双路收集器同位素比率质谱仪（IRMS）之前，填充柱气相色谱仪（GC）分离 N2 及 CO2。对于预分离或者未分离的材料，该系统看起来是有效的系统，但是，不能与另一分离装置（即 GC 或 HPLC）连续耦接，因为每个分析需要几分钟。

化学反应接口质谱仪（CRIMS）的背景

马基（Markey）和艾布拉姆森（Abramson）发展了化学反应接口：一种在氦环境中把复杂的分子完全分解为其元素的微波功率源装置。反应气体如氧的加入，产生稳定的氧化产物，它反映了最初分析物的元素成分，并且用一个单级收集器质谱仪**探测。这个过程的基本特征，可以图示如下(虽然被大大简化了)：

$$ABCD + 4X \rightarrow \begin{matrix} & & X & & C \\ & A & & X & \\ D & & X & & B \\ & & X & & \end{matrix} \rightarrow AX + BX + CX + DX$$

一个由字母 A B C 和 D 代表的诸元素组成的复杂分子，与氦流中附加的反应气体 X 混合。在化学反应接口质谱仪（CRIMS）分析器中，如果 B 是所

**单级收集或传统的质谱仪是指，对两种质量顺序地，而不是同时地进行扫描和探测的任何一种仪器。在这里绝大多数四极质谱仪、磁性扇面质谱仪、离子阱质谱仪及飞行时间质谱仪，都是单级收集器。

研究的元素或同位素，它能用任何质谱仪按 BX 的特征质量来监测。参考 C1 的图 1 表示了气相色谱仪/化学反应接口质谱仪（GC/CRIMS）的简图。毛细管气相色谱仪和化学反应接口质谱仪(GC/CRIMS)的结合，使分析者可以有选择地探测以稳定同位素标记的物质。如果分子 BX 已被选定用来监测特定的同位素，比如说在 M+1，只表示富集的 BX 的色谱图就可以依照方程 1 来产生：

富集的 BX = M+1 的 BX （减去） 预计来自 M 的 BX M+1 的天然丰度 [方程 1]

这个方程从 BX 中去除天然同位素丰度的贡献，这就只剩下来自由示踪剂引起的 BX 的 M+1。这就提供了化学反应接口质谱仪（CRIMS）的同位素选择性探测能力。

化学反应接口质谱仪（CRIMS）是一个对生物系统中的同位素或元素进行探测和计量的灵敏的、可选择的和可靠的办法。各种化学反应接口质谱仪（CRIMS）实验已经成功地利用尿，血浆，组织提取物，培养中的隔离肝细胞，细胞培养基而没有母体问题。

发明者用同位素比率质谱仪（IRMS）估计了来自天然的分析物在同位素丰度方面与酶有关的差别。原封未动的生物大分子的同位素分析很有价值，因为避免了费时的水解和衍生区。

*例 1：*人类生长激素试样在 $^{13}C/^{12}C$ 比率上的差别。

由于用产生生物合成蛋白质的大肠杆菌可在不同起源的培养基源中生长，因此，复合蛋白质的同位素特征可能不同于内成分子，如睾酮那样。为了验证该假设，发明人获得了三种 rhGH 试样，以及来源于人体脑下腺的 GH。按照管形瓶上提供的说明把每种复合试样溶于蒸馏水中。按照与其一同接收的说明把垂体 GH 溶于 0.03M $NaHCO_3$ 及 0.15M NaCl 中。把 20 微升试样注入近来研制的高性能液相色谱仪/同位素比率质谱仪（HPCL/IRMS）系统，该系统使用化学反应接口（CRI）把被分析物转换为用于同位素比率测量的 CO_2。

发明人使用通过离线燃烧及常规的气体入口同位素比率质谱仪（IRMS）法测得的同位素比率为 -21.03 $\delta^{13}C‰$的马白蛋白作为凝聚相内部标准。各注射液含有 2 微克白蛋白（30 微微摩尔）及 2-3 微克（100-150 微微摩尔）rhGH。

活动相是 0.1%的三氟乙酸（TFA）及也含有 0.1%三氟乙酸（TFA）的乙腈。在 30%的乙腈中保留 2 分钟之后，利用 Isco Model 260 双注射器泵系统，10 分钟内溶剂成分增大为 70%乙腈。流速为 1 毫升/分钟。利用 PerSeptive Biosystems Poros R2 柱（长 30 毫米，内径 2.1 毫米）进行分离。带有 Isodat 软件的 Finnigan/MAT Delta S 同位素比率质谱仪（IRMS）被用于测量同位素比率。氧是化学反应接口（CRI）的反应气体。

用 $\delta^{13}C‰$，这些配制剂的平均值及 SD 值是：人体垂体：-11.31±0.71；Genentech Nutropin®，-12 .84±0.90；Genentech Protropin®，-10.25±0.56；Lilly Humatrope®，-18.47±0.50（n=7-8）。每种情况下，观察到的同位素比率不同于垂体 GH（借助 Student-Newman-Keuls 多级比较 $p<0.05$）。在实用方面，只有 Lilly 产品具有与垂体 GH 显著不同的碳同位素比率。应认识到如果制造商改变大肠杆菌生长介质中的成分的来源，生物合成试样上测得的碳同位素特征彼此将发生显著的改变。

*例子 2：*质量平衡研究

本发明改进了采用稳定同位素的性能，所以就可减少放射性同位素的使用就。采用放射性的一种特殊的“标准”方法是质量平衡研究。标记物质被给予某个生物系统，捡验来自该系统的碎片，以得到它们的标记含量。典型的标记物是 14C，闪烁谱测量法有效地纪录标记物量而不管它的化学形式。如果是用动物，生物试样，可以用如尿，胆汁，粪便，唾液等生物样品。如果是用细胞系统，人们或许对细胞计数。发明人为此目的对直接引入高性能液相色谱仪/化学反应接口-同位素比率质谱仪（HPLC/CRI-IRMS）系统进行评估。

发明人已经对新的高性能液相色谱仪/化学反应接口/同位素比率质谱仪（HPLC/CRI/IRMS）测试设备探测尿液中 ^{13}C 标记的微量药物的能力作了估测。该办法是用一个流注入器，在微波功率源化学反应接口燃烧成 $^{13}CO_2$ 之前，把尿样先传送进一个解溶系统。这个设备对于少于 50 μg/ml（毫微克/毫升）的超量 ^{13}C（大约 0.5 微克/毫升的 $^{13}C_2$ 标记的氨基比林）的量化能力优于以前用离线燃烧办法对尿中 ^{13}C 含量检测限度。这些结果支持以前的发现，即质量

表1，化学反应接口质谱仪（CRIMS）化学物一览表

元素或同位素	产物[a]	质量[a,b]	反应物	参考
$^{1,2}H$	$^{1,2}HF$	20,21	NF_3	24,25
H	H_2O	18	SO_2[c]	9
^{2}H	$^{2}H^{1}H$	3.022	H_2	9
$^{12,13}C$	$^{12,13}CO_2$	44,45	SO_2	9
C	CO	28		9
^{14}C	$^{14}CH_4$	18.034	H_2	4,5
C	CH_4	16		5,9
	C_2H_2	26		5,9
	HCN	27	N_2	5
$^{12,13}C$	$^{12,13}CF_4$	69,70(CF_3^-)[d]	NF_3	24,25
$^{14,15}N$	$^{14,15}NO$	30,31	SO_2	9
	N_2	28,29		6,9
	NO_2	46,47		6,9
N	HCN	27,28	H_2	5,9,19
O	H_2O	18	H_2	19
$^{16,18}O$	$C^{16,18}O$	28,30		19[e]
P	PF_5	107(PF_4^-)	NF_3	24,25
S	$S^{35,37}Cl$	67,69	HCl	20
	SF_6	^{127}(SF_5^-)	NF_3	24,25
Cl	$H^{35,37}Cl$	36,38	SO_2	21,22
	$F^{35,37}Cl$	54,56	NF_3	24,25
Se	$^{80}Se^{35,37}Cl$	115,117	HCl	23
Br	$H^{79,81}Br$	80,82	SO_2	21

a. 只对那些对于一个以上的同位素有用的核素才标多个质量

b. 标出精确的质量是表示要得到所选的结果需要高的分辨率

c. SO_2表示反应气体，其他如O_2也能用，产物一样，但产额不同

d. ^{13}C的选择性探测是可能的，但还没有证实

* O^{16}的探测是来自这个实验室（未发表）

平衡研究可以用同位素比率质谱仪（IRMS）来实现，这里用的剂量低至 1 毫克/公斤。

发明人还用一个直接的探针作为将试样导入同位素比率质谱仪（IRMS）的手段，对选择的元素或同位素进行了分析。并且观察到聚蛋氨酸的氧化物低至 20ng 所产生的 SO2 的线性关系。发现不同成分的 1 微克水平上的 12 种蛋白质，在理论上的和观测到的 S/C 原子含量之间的令人满意的关系 (r=0.8)。

*例子3，*在化学反应接口质谱仪（CRIMS）中氯化学的评估

在如下的例子中，所用的气相色谱仪/化学反应接口质谱仪（GC/CRIMS）系统是用 30 米长，0.25 毫米内径，0.1 微米厚的薄膜的 DB-5 毛细管装备的 Hewlett-Packard 5890II/5971A 质谱仪装置。一个微波功率源化学反应器接口(CRI)被安装在色谱柱和质谱仪的入口之间的气相色谱炉内。氦的流量是0.5ml/min。一个 T 形接头套管用来将色谱柱，化学反应接口（CRI）和反应气体管连起来。反应气体流并不测量，但它在总的气体流中只是很小一部分，因为足够多的反应气体能够淬灭氦等离子体(17)。化学反应接口（CRI）包括一根 0.63 厘米(1/4 吋)外径，0.16 厘米(1/16 吋)内经，长 12.70 厘米(5 吋)的铝管和一个不锈钢的微波腔，用来传输 100 瓦，2450 兆赫的微波产生器的微波。一个 Teknivent Vector 2 数据系统用于控制质谱仪和处理数据。在所有的实验中，1 微升的溶剂是以不间断的方式注入，在注入并让溶剂的前缘通过之后 5 分钟，开始获取数据，然后，点燃化学反应接口（CRI）中的微波感应等离子体。

根据所要做的分析，可以把质谱仪设置在下面列出的任一质量或全部质量的选定的离子监测（selective ion monitoring, SIM）模式。下面的反应表示被探测物质所含的元素，产物，分裂出的离子和质量：

C □ CF_4 (CF_3^+, m/z 69)

H □ HF ($^1HF^{+\cdot}$, m/z 20; $^2HF^{+\cdot}$, m/z 21)

O □ F_2O ($F_2O^{+\cdot}$, m/z 54) + 其他的氧/氯产物

P □ PF_5 (PF_4^+, m/z 107)

Cl □ ClF ($^{35}ClF^{+\cdot}$, m/z 54; $^{37}ClF^{+\cdot}$, m/z 56)

S □ SF_6 (SF_5^+, m/z 127)

碳的探测：因为所有选用的化合物都包含碳，所以碳信号不是选择的。用 m/z 69 对碳被监测。

氮的探测：在化学反应接口（CRI）中，NF_3 被完全分解成 N_2 和 F_2。因此，包含氮的化合物无法探测，因为本底太高。相对稳定的 NF_2 的总的分解表明，N_2 是任何包含氮的被分析物的产物，如果 F_2 被选为反应气体而不是 NF_3 的话。可用 m/z 28 和 29 来探测氮。

磷的探测：用 1 毫微克/微升到 1000 毫微克/微升的一系列 TBOEP 溶液，在甲苯中制备，用磷酸三丁脂（TBP）作内标准（10 微克/微升）。气相色谱仪的色谱柱的温度开始是 90℃，持续 2 分钟，然後以 40 由程序控制以 40℃/分的速率上升至 140℃，然后再以 10℃/分的速率上升至 270℃，并保持 5 分钟。选定的离子检测程序(SIM)用 m/z 20，69 和 107。

重氢的探测：重氢标记的氨基酸被用作为试样：一组水溶液用 L-苯基丙氨酸_d_8，浓度从 69 微微克/微升，至 69 毫微克/微升，和 L-白氨酸-d_{10}，以及非标记的 L-苯基丙氨酸，恒定的浓度（65 毫微克/微升和 63 毫微克/微升）。这些溶剂是用如下方法制作的：100 微升的干溶剂，加入 50 微升的 MSTFA 和 50 微升干的氰甲烷，在密封的反应管形瓶中在 100℃，加热 30 分钟。气相色谱仪的色谱柱的温度设置在 70℃，保持 2 分钟，然後以 30℃/分的速率上调至 100℃，保持 1 分钟，再以 15℃/分的速率上调至 200℃，保持 5 分钟。SIM 模式使用 m/z 20，21 和 69。

硫的探测：L-蛋氨酸的水溶液，浓度 66 微微克/微升至 66 毫微克/微升，以 L-半胱氨酸为标准（24.5 毫微克/微升）。溶液的制备同前。气相色谱仪的色

谱柱的温度设在 70℃，保持 2 分钟，然后以 40℃/分的速率上调至 130℃/分，保持 3 分钟，再以 2.5℃/分的速率上调至 150℃，再以 20℃/分的速率上调至 250℃，保持 1 分钟。MSD 取 SIM 模式，用 m/z 69 和 127。

氯的探测：苯甲二氮卓(diazepam)的一系列甲苯溶液，浓度在 0.68 毫微克/微升至 680 毫微克/微升，用 7.2 毫微克/微升的 DDT 作为内部标准。气相色谱仪的色谱柱的温度在 70℃，保持 2 分钟，然后，以 30℃/分的速率上调至 210℃，再以 10℃/分的速率上调至 250℃，保持 5 分钟。MSD 取 SIM 模式，用 m/z 20，54，56 和 69。

八种化合物的混合物被用于示范所有目标物质的同时或选择性探测：它们是硝基苯-d_5，磷酸三丁脂（TBP），咖啡因，戊硫代巴比妥，棕榈酸甲脂，硬脂酸甲脂，TBOEP，和苯甲二氮卓。这些化合物的浓度不作精确测量，分别在甲苯中蒸发和还原之后，它们大约在 100，10，150，100，150，300，30 和 150 毫微克/微升。不使用氨基酸，因为它需要衍生化，从而增加了试样的复杂性。气相色谱仪的色谱柱的温度在 70℃，保持 2 分钟，然后以 30℃/分的速率上调至 120℃，再以 10℃/分的速率上调至 250℃，保持 5 分钟。质谱仪的 MSD 取 SIM 模式，用 m/z 20，21，56，69，107 和 127。

以接受环磷酰胺的病人得到的兼容的等离子体试样是在美国粮食与药物管理局实验室按如下步骤作的。用盛有 2 毫升的氰甲烷，1 毫升的甲醇，1 毫升 2 百万单位的单基钠磷酸盐（PH 为 4.6），250 微升包含氧-五氟苯甲基-羟胺（O-pentafluorobenzyl-hydroxylamine） HCl（50 毫克/毫升）的甲醇溶液，和氧-五氟-苯甲基 （O-pentafluoro-benzyloxime） 派生的 $^2H_4$-氧代磷酰胺（$^2H_4$-aldophosphamide）(16 微克/毫升) 的采血样管截获活性的代谢产物。至少三小时后，对这些试样离心脱水，浮在表层的部分被除去，再混入 1 毫升的 $CHCl_3$。在搅匀后，1.6 毫升的底部的有机层被除去，再脱水，添加 250 微升氰甲烷和 60 毫升氮-(t-丁基二甲基甲硅烷基-氮-甲醛三氟乙酰胺（N-(t-butyldimethylsilyl)-N-methltrifluoroacetamide）在室温下，对残留物硅烷化一小时。

一旦一项分析物由色谱柱进入了一个由氦携带且混合有反应气体的化学反

应接口（CRI），分析物和反应气体都由微波产生的等离子体分解成原子。当原子离开反应室，它们按其化学热动力特性重新组成小分子。一个选定离子监视模式的质谱仪作为探测器去选择性地测量这些新形成的分子。该质谱仪提供定性的（出现了何种元素或同位素）和定量的（出现的元素或同位素有多少）信息。

在研究氟化学前，已被研究的化学反应接口质谱仪（CRIMS）反应气体可按其化学性质分成两类；氧化剂和还原剂。氧化剂反应气体是 O_2，CO_2，和 SO_2，还原剂反应气体是 H_2，HCL，NH_3，N_2。发明者最初的，产生挥发性的稳定的包含磷的化学反应接口质谱仪（CRIMS）产品的战略，是基于马修莫托（Matsumoto）的观察（见参考 18），即 PH_3 可由磷酸盐在还原性的环境中生成，使用这些气体对含磷化合物的选择性探测的努力没有成功。

在反应界面上采用富氟的环境的新战略被评估。起初，由 SF_6 作为氟源。当 SF_6 作为反应气体时，磷被转化为 PF_5，可用 m/z 107（PF_4^+）选择性地探测到，这是 PF_5 质谱上的最大峰。这是对磷进行的选择性探测的第一次成功的化学反应接口质谱仪（CRIMS）实验。

然而，SF_6 不是一种好的反应气体，原因如下：首先，P 选择性探测通道，也就是 m/z 107，会被 SF_6 和 O_2 的一种化学反应接口质谱仪（CRIMS）产物 $^{34}S^{16}OF_3^+$ 所影响。另外，SF_6 天性非常稳定且不能生成高反应性氟的环境。反而的确证明使用氟的化学反应接口质谱仪（CRIMS）化学过程可以生成 P 选择性物质这一概念。

使用比较活性的 NF_3 是成功的。NF_3 在大多数情况下产生 N_2 和 F_2 产物，除了不能自己重新组合外，NF_3 的化学性质与 SF_6 相似。SF_6 好在能够重组。在富含氯的环境中，不仅 PF_5 容易形成，而且根据上面列出的反应式，其他物质应受到注意。

这个由氯引起的流程不仅提供了对磷的选择性探测，它对某些其他元素，如氯，硫和他们的同位素成分，以及氢，碳，和预计氮与氧的同位素都是有益的。ClF 是 CRIMS 从有机化合物产生的氯的产物。M/z 54 和 m/z 56 都能用作探测道。但是，m/z 54 可能受到 SF_4^{++} 的干扰，当硫存在时，它是 SF_6 质谱

的， CRIMS 的一个产物。另一个关心的组合物是，F_2O^+，在 m/z 54，可以是氧的 CRIMS 产物，虽然，在用含氧的组合物作的试验中，在 m/z 54 未显示有峰。如果没有含硫的化合物存在，则会出现峰，可以用 m/z 54，因为，它提供比 m/z 56 通道多三倍的更丰富的物质。含硫的化合物的选择性探测道是 m/z 127(SF_5^+)，SF_6 质谱中的基本的峰。SF_6 是硫在氟环境中 CRIMS 的首要产物。

氟化氢是 CRIMS 从有机化合物中产生的氢原子的主要产物。发明人发现，m/z 20 和 21 可以被用于选择性地测量氢和重氢。当 m/z 20 为非标记的有机化合物提供普通的探测道时，m/z 21 是含重氢的化合物的一个选择探测道。前述的有选择地监测重氢的办法，用 H_2 作为反应气体，并且在 m/z 3.022 以分辨力 2000（2，14）监测 HD。它的两个缺点是，它需要一个高分辨的质谱仪，而且既不能监测氢也不能测量 D/H 比率，因为大量的 H_2 用作反应气体。这里说的办法可以避免上述问题。

CF_3^+ (m/z 69) 可以被用作为普通的碳探测道。监测 m/z 70 可以提供 ^{13}C 的探测道，而 m/z 70/69 比率将产生一个碳同位素的比率。

磷：为了测定灵敏性和动态范围，使用了一系列 TBOEP 甲苯的溶液。用 M/z 107 离子作选择道。在累计测量了三百毫秒后，取得了 TBOEP 的探测极限，信号噪声比大于 3。在半高处有 8 秒的峰宽度，这相当于对磷元素探测的 10 微微克/秒。如下文所述，这个灵敏水平起码比最好的 CRIMS 仪器测得的期待值高一个数量级。线性动态范围起码高三个数量级，而关联系数 (R^2)达到 0.997。把含 100 毫微克/微升的 TBOEP 和 TBP 试样的溶液多次注入来测重复性，两个成分峰的面积比，在 n=5 时的相对标准偏差(RSD)为 3.2%。

重氢：苯基丙氨酸-d_8 和白氨酸-d_{10} 被用来测定灵敏性和线性动态范围，结果表明线性动态范围大于两个数量级，相关系数为 0.994。重复性试验表明 60 微微克白氨酸-d_{10} 与苯基丙氨酸-d_8 内部标准的面积比为 RSD 2.9%(n=5)。在单独的试验中，苯基丙氨酸-d_8 的探测极限为 60 微微克，累计时间 300 毫秒，s/n > 5。

用一组含不同含量的 L-苯基丙氨酸-d_8 和恒量的未标记 L-苯基丙氨酸，作

为它们的 diTMS 衍生物，对重氢的浓缩进行了研究。CRIMS 方法的 D/H 比率是从 m/z 21(D) 和 m/z 20(H)色谱峰面积检验得到的。发明人把 D/H 的实验比率和理论相比较时，发现了一些非线性，尤其当 L-苯基丙氨酸-d_8 的浓度比较低时。为了检验这个问题，用别的办法得到 D/H 的比率，用“标准”的 GC-MS 模式（把 CRIMS 的电源关掉），从 m/z 200（ M-COOTMS-for-d_8，和 m/z 192(M-COOTMS for-d_0)的 SIM 色谱测得峰面积比率。它们是标记和非标记 diTMS 苯基丙氨酸-d8 最丰富的 MS 峰，考虑到氢原子在 diTMS 苯基丙氨酸-d_8 中的比分，把 200/192 比率转化为 D/H 的比率。发明人发现，这两种方法得到的结果在误差范围内互相一致。关联系数 0.9961 时，斜率 0.94。当复核理论数据後，得到关联系数 0.9971 时，斜率 0.81。上述非线性或许是由于浓度的误差或是试样不纯，或是别的仪器问题，例如，离子与分子反应（19），放大器的非线性，但不会是 CRIMS 的原因。

硫：一组含硫的氨基酸溶液被用于这个研究。L-蛋氨酸用作为试样，L-半胱氨酸作为内部标准。蛋氨酸从 200 微微克至 66 毫微克是线性的。这并不意味着 66 毫微克一定是线性动态范围的上限。虽然 200 微微克的 L-蛋氨酸产生了一个变形的峰，这意味着在 CRI 中不是色谱术就是化学本身不对。经过 400 百万秒的累积时间，对于 L-蛋氨酸，200 微微克的探测下限以信噪比为 3 被得到了。用 20 微微克的 L-蛋氨酸和 24 微微克的 L-半胱氨酸得到 RSD 为 4.4%(n=5)。

以前，当 HP 5971A MSD(惠普的仪器名)用 SO2 作为反应气体时，探测极限是 1 毫微克（17)。这是与现今用 NF3 作为反应气体得到的结果，对于同样成分下限 2 微微克是一致的。那个报告(17)比较了 Extreal C50/400 和 HP 5971A MSD 的性能。对氯 2 微微克的探测下限并不显得比以前用 SO_2 作为反应气体得到的 50 微微克更好，那个结果是用 Extreal 仪器和一个专用的 2.1MHz 的功率源以减少传输和低质量时的分辨得到的。

氯：也可选择性确定含氯化合物，如以前那样（9），在甲苯中制备一组重氮异胺溶液，并用 p,p'-DDT 作为内部标准。在 M/z 56 的离子或 $^{37}ClF^{+\cdot}$ 被用作选择性探测道。在信噪比为 3 以及 300 百万秒的累计时间下，探测极限为

2 毫微克重氮异胺。以关联系数 0.9996 得到三个数量级的线性动态范围。用 130 微微克重氮异胺和 50 毫微克的 DDT 的重复性试验得到 3.4%(n=4)的 RSD。

碳：用于碳探测的质量是唯一的。这些质量的唯一性意味着可选性。对于所有注入材料，检测碳道，显示出高的灵敏度。

氮：如前所述，使用 NF_3 抵消了监测洗提入 CRI 中的物质中的氮含量的能力。

选择性

为了研究选择性，准备了含有多种元素的八种化合物的混合物。M/z 20 处的离子用来监测所有有机物中所含的氢，m/z 21，56，107 和 127 分别用于同时检测含氘，含氯，含磷及含硫的化合物。结果表示这些通道的的色谱都是高选择性的。

检测含磷药物的应用

环磷酰胺（Cyclophosphamide）是一种防癌药物，其结构中含一个磷和两个氯原子。使用 NF_3 作为反应气体，CRIMS 能同时检测磷和氯，因此，看来是分析该药物及其代谢物的理想选择。某位服用 cyclophosphamide 的病人的血浆可用 CRIMS 同时作磷和氯含量的分析。H 通道显示了复杂的色谱，而在 P 选择通道中只有六个峰值，Cl 选择通道中有五个峰值。借助氯通道中的响应，确认除了第一个峰值之外，磷通道中的所有峰值都与 cyclophosphamide 相关。

磷通道中第一个峰是与三个 t-butyldimethylsily（TBDMS）基团甲硅烷基化的磷酸盐，这是由其质谱分析确认的。一个 TBDMS 衍生的 cyclophosphamide 标准溶液显示了三个峰，它们与试样色谱图中的峰 2，3 和 5 的滞留次数匹配。峰 5 被发现是 TBDMS-cyclophosphamide。峰 3 是未衍生的 cyclophosphamide。峰 2 显示其氯/磷面积比是其它两个峰的一半。这说明 cyclophosphamide 的两个氯原子有一个丢失。该峰的质谱说明两个氯乙基键中的一个丢失。

这一试验结果说明，即使对于复杂的，生物衍生试样，用 NF_3 的 CRIMS 可以有选择地探测含 P 和 Cl 的化合物。这些药物符合了“内部标记”

（“intrinsically labeled”）的定义，于是可简化新陈代谢研究，因为在药中结合“外来的”同位素标记的特殊合成是不必要的。

NF_3 代表了 CRIMS 反应气体的一个新概念。通过提供氟化反应环境，允许选择性地同时检测磷，氘，碳，氯，硫，可能还包括氮和氧。这一方法是灵敏的，线性的，可重复的。随着可被 CRIMS 选择性检测元素和同位素种类的不断增加，其应用也将越来越广。

谷胱甘肽和 clozapine 研究

发明者引出了一种关于安定药 clozapine 和三缩氨酸 glutathione 用共价键连接的研究。其他主要使用放射性同位素的工作者，已发现了 clozapine 及 glutathione 的许多加合物。发明人利用引入 HPLC 的化学反应接口/质谱仪技术(HPLC/CRIMS)询问 clozapine 中的氯原子作为放射性同位素示踪的一种替换有多好。药物和带有过氧化物酶/过氧化物系统的 glutathione 的孵化产生了几种代谢物，其特征就像是 clozapine 被电喷镀（electrospray）质谱术的新奇共轭。利用 NF_3 作为 CRIMS 反应气体，通过检查孵化混合物，确认两个共轭物的识别。Cl 和 S 的同时出现与 clozapine 和 glutathione 的共价键联相一致。S/Cl 在一个峰里近于两倍的比率证实 di- glutathione 共轭物的存在。这些试验支持申请人的主张，结合 CRIMS，HPLC 支流的元素选择性检测可以提供用放射性同位素方法得不到的额外信息。人们可以看到，两种元素物质集中在 10 到 15 分钟这段时间的几个峰。说明，clozapine 的 eh 氯和 GSH 的硫都是存在的。基于电喷镀（electrospray）数据，13.2 分钟处的峰是 hydroxyclozapine 的单 GSH 加合物。如果在 S 和 Cl 道之下的面积基于其结构被 1:1 刻度，那么刚好在它之前，12.3 分钟处的峰具有为 1.83 的 S/Cl 比率。这接近于对 ESI 数据建议的 di-=GSH 共轭结构所预期的 2.00。这些实验证明，元素选择性探测可以是进行药物新陈代谢研究的一个重要工具。当测试物质含有 C,H,O,或 N 以外的元素时，这样的元素就可以成为和同位素标记一样有效地追踪母物质的最终结果。即使当未知药物或生化代谢物的分子不含任一种上述这些其它核素时，加一些不常见的元素—硫酸盐化，phosphorylation,和 thioether linkages—的化学改变

也能被检测。这些信息将补充传统的分析途径去鉴认代谢物。这里，申请人表示了进行分子内元素成分测量的能力。当申请人已在为该目的设计的实验中利用 GC/CRIMS 测量 C/Cl 的比率时，申请人就已经达到好于 10%的精度和准度（Song 及 Abramson,1993），并且如果进行足够的重复，可以得到 5-10%之间的变化系数。

参考文献

(1) Markey, S.P.; Abramson, F. P. Anal. Chem. 1982, 54, 2375-2376.

(2) Chace, D.H.; Abramson, F.P. Anal. Chem. 1989, 61, 2724-2730.

(3) Morré, J.T.; Moini, M.Biol. Mass Spectrom. 1992, 21, 693-699.

(4) Chace, D.H.; Abramson, F.P. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1990, 19, 117-122.

(5) Chace, D.H.; Abramson, F.P. J. Chromatogr. 1990, 527, 1-10.

(6) Chace, D.H.; Abramson, F.P. In Synthesis and Applications of Isotopically Labelled Compounds, 1988; Baillie, T.A.; Jones, J.R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1989; p.23.

(7) Abramson, F.P.; Markey, S.P. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 1986, 13, 411-415.

(8) Moini, M.; Chace, D.H.; Abramson, F.P. J.Am. Soc. Mass Spectrom. 1991, 2, 250-255.

(9) Song, H.; Abramson, F.P. Anal. Chem. 1993, 65,447-450.

(10) Kusmierz, J.J.; Abramson, F.P. Biol. Mass Spectrom. 1993, 22, 537-543.

(11) Teffera, Y.; Abramson, F.P.; Mclean, M.; Vestal, M. J. Chromatogr. Biomed. Appl. 1993, 620, 89-96.

(12) Song, H.; Abramson, F.P. Drug. Metab. Disp. 1993, 21, 868-873.

(13) Li, G.; Moini, M., Proc. 42nd ASMS Conf. Mass Spectrom., 1994 p.293.

(14) Teffera, Y.; Abramson, F. Biol. Mass Spectrom. 1994, 24, 776-783.

(15) O'Brien, M.J. in "Modern Practice of Gas Chromatography",Grob, R.L.Ed., 1985, p.272.

(16) Quimby, B.D.; Sullivan, J.J., Anal. Chem. 1990, 62, 1027-1034.

(17) Song, H.; Kusmierz, J.; Abramson, F.; McLean, M. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1994, 8, 765-771.

(18) Matsumoto, K., Fujiwara, K., and Fuwa, K. Anal. Chem. 1983, 55, 1665-1668.

(19) Patterson, B.W.; Wolfe, R.R., Biol. Mass Spectrom. 1993, 22, 481-486.

(B1) Barrie, A., Bricout, J., and Koziet, J. Gas chromatography-stable isotope ratio analysis at natural abundance levels. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 11: 583-588 (1984).

(M1) Markey, S.P. and Abramson, F.P., Capillary gas chromatography/mass spectrometry with a microwave discharge interface for determination of radioactive-carbon-containing compounds. Anal. Chem. 54: 2375-2376 (1982).

(M2) Markey, S.P. and Abramson, F.P., Element and isotope specific detection by capillary gas chromatography-mass spectrometry using a microwave discharge interface; in: W.P. Duncan and A.B. Susan (Eds.), Synthesis and Applications of Isotopically Labeled Compounds. Proceedings of an International Symposium, Kansas City, MO. U.S.A., 1982, Elsevier, Amsterdam; 291-296,1983.

(M3) Matthews, D.E., and Hayes, J.M., Isotope-ratio-monitoring gas chromatography-mass spectrometry. Anal. Chem. 50: 1465-1473 (1978).

(S1) Sano, M, Yotsui, Y., Abe, H., and Sasaki, S., A new technique for the detection of metabolites labelled by the isotope 13C using mass fragmentography. Biomed. Mass Spectrom. 3: 1-3 (1976).

上面的描述和例子，其目的，是为了图示本发明的若干具体化而不加什么限制。对于本领域的技术人员而言，不难在本发明的精神和豁区之内作出修改

和改变。所有在此引用的专利和出版物也就是以他们的参考的形式整体地参加了合作。

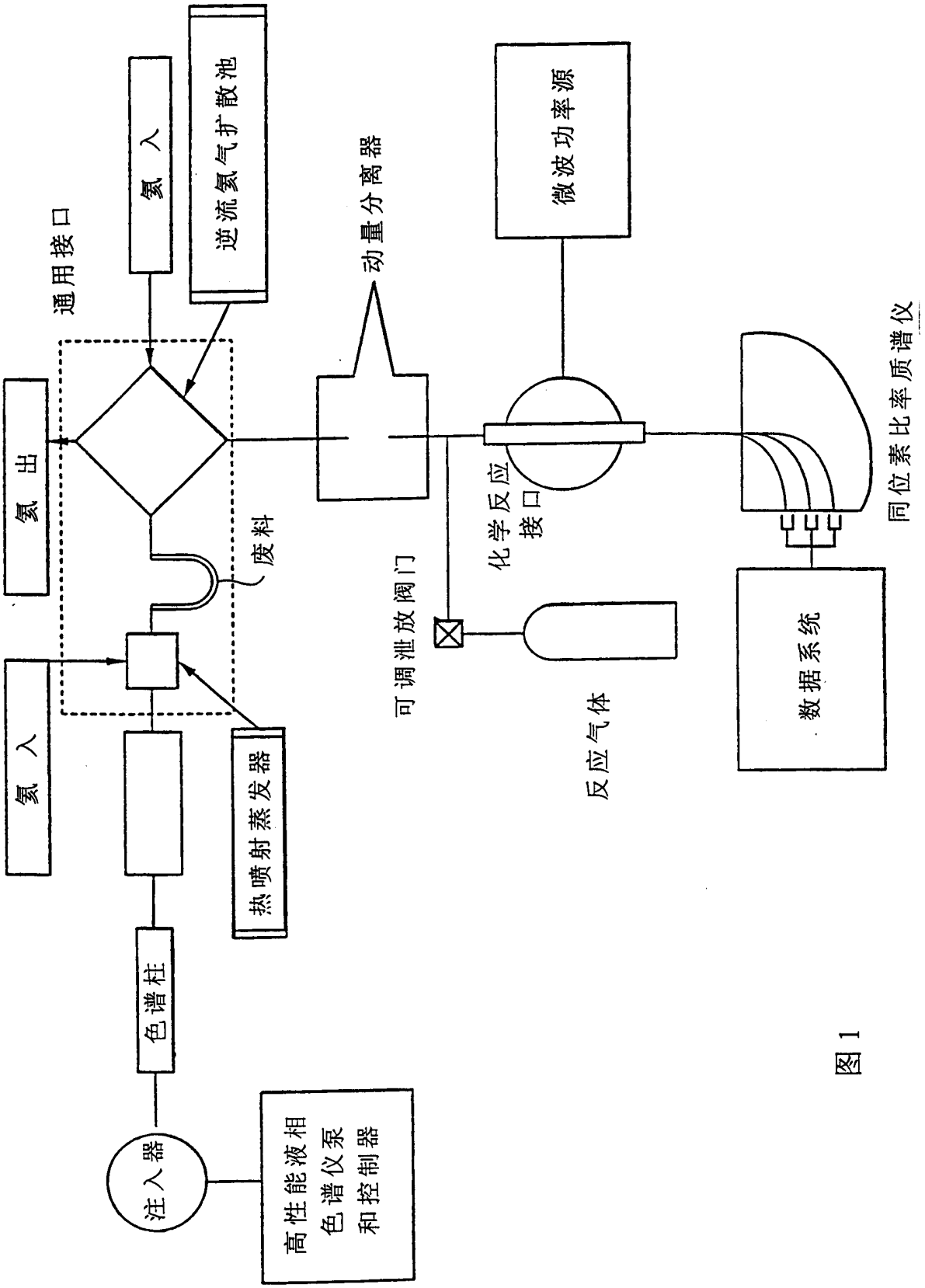

高性能液相
色谱仪泵
和控制器
注入器
色谱柱
热喷射蒸发器
氦 入
氦 出
通用接口
氦 入
逆流氦气扩散池
废料
动量分离器
可调泄放阀门
化学反应
接口
反应气体
微波功率源
数据系统
同位素比率质谱仪

图 1

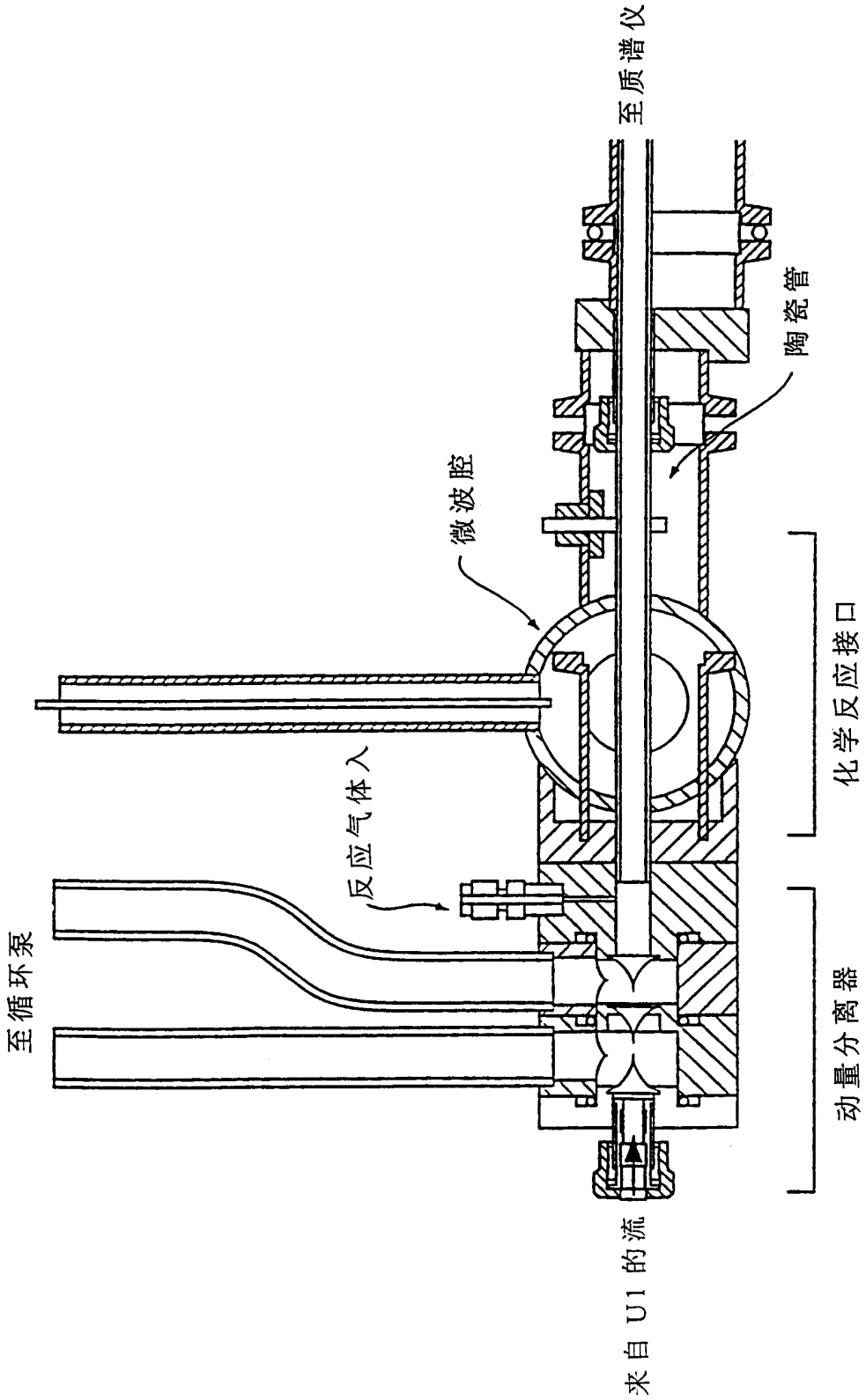


图 2

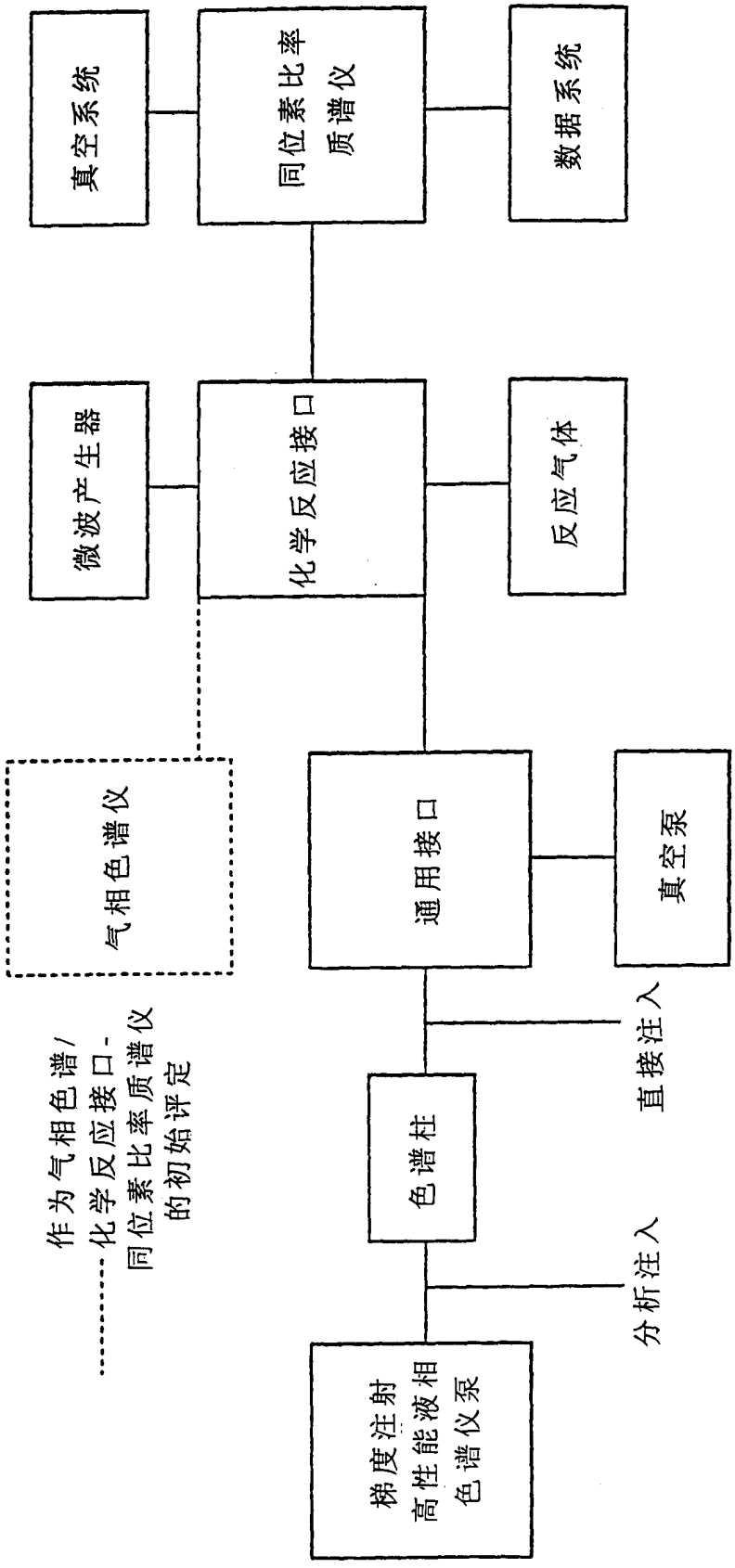

真空系统
同位素比率质谱仪
数据系统
微波产生器
化学反应接口
反应气体
气相色谱仪
通用接口
真空泵
作为气相色谱/化学反应接口-同位素比率质谱仪的初始评定
色谱柱
直接注入
分析注入
梯度注射高性能液相色谱仪泵

图 3

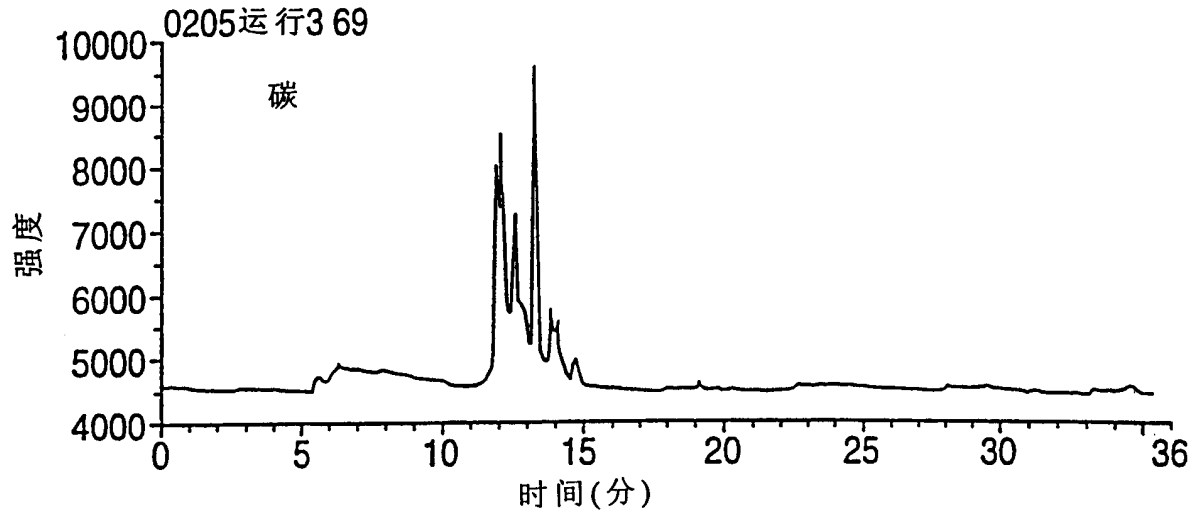

0205运行3 69
碳
强度
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
0
5
10
15
20
25
30
36
时间(分)

图 4a

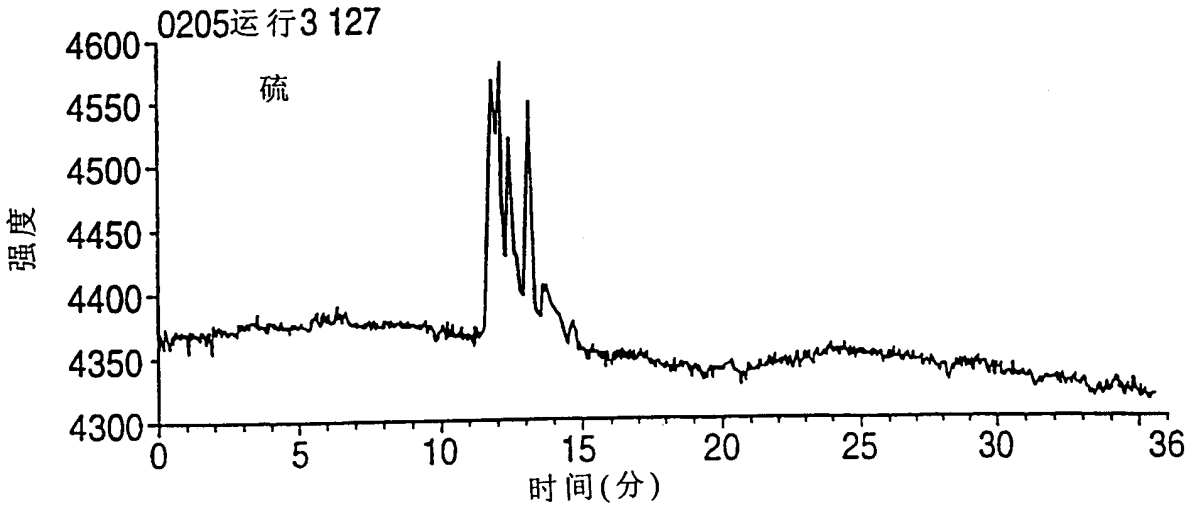

0205运行3 127
硫
强度
4600
4550
4500
4450
4400
4350
4300
0
5
10
15
20
25
30
36
时间(分)

图 4b

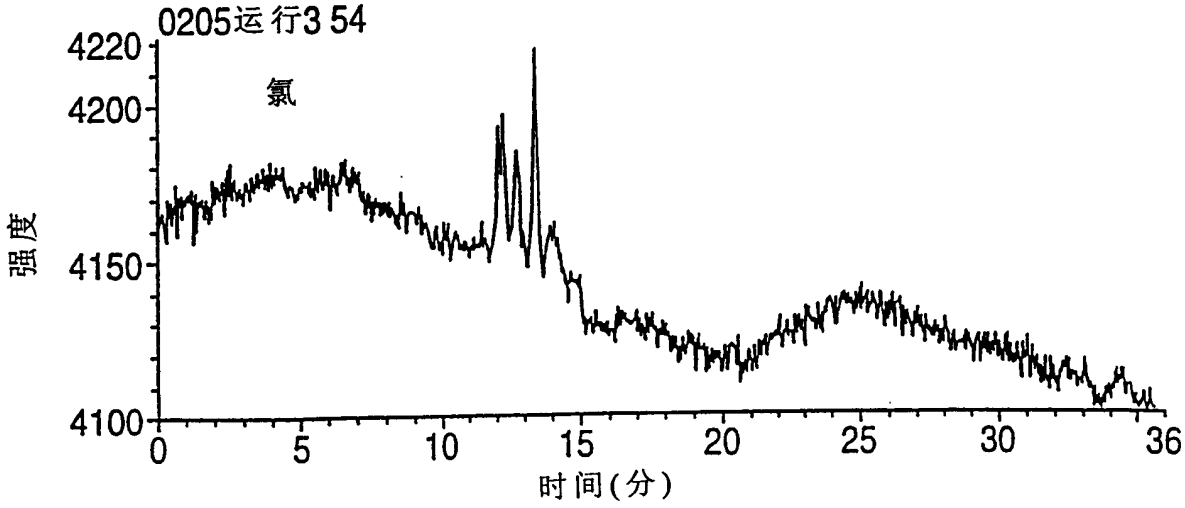


图 4c