

在单位质量分辨质谱仪上通过准确质量确定化合物的元素组成

李斌¹, 欧阳伟民¹, 顾鸣², 王永东²

(1.北京绿绵科技有限公司, 北京, 100080; 2.Cerno Bioscience, 14 Commerce Dr., Danbury, CT 06810, USA)

摘要: 众所周知, 单位质量分辨的质谱仪(如四极杆质谱仪), 质荷比的测定只能准确到 0.1~0.5 Da, 使其定性能力受到极大制约。本文介绍了一种新颖的质谱峰形线性轮廓校正技术——MassWorksTM, 它在校正质量轴的同时对质谱峰形函数进行校正, 使得在单位质量分辨的质谱上的质量测定数精确至 0.00x Da, 也使得单位质量分辨质谱分析未知离子或离子碎片的元素组成成为可能。

关键字: 单位质量分辨质谱; 准确质量数; 线性轮廓校正; 元素组成

Determine the elemental composition of unknow compounds by accurate mass on unit mass resolution mass spectrometer

Li Bin¹, Ouyang Weimin¹, Gu Ming², Wang Yongdong²

(1.Beijing Lumiere Tech Limited, Beijing, 100080, China; 2.Cerno Bioscience, 14 Commerce Dr., Danbury, CT 06810, USA)

Abstract: On a unit mass resolution mass spectrometer such as a quadrupole mass spectrometer, its has been widely know that the mass (m/z) can only be measured to 0.1~0.5 Da accuracy, so that its qualitative ability is greatly restricted. In this paper, a novel mass spectral line shape calibration technology, MassWorksTM, is introduced to comprehensively calibrate not only the m/z values but also the mass spectral peak shape. With this comprehensive mass spectral calibration, a high level of mass accuracy on the level of 0.00x Da can be achieved even on a unit mass resolution mass spectrometer, which will now enable the elemental composition determination of unknown ions or ion fragments using a unit mass resolution mass spectrometer.

Key words: unit mass resolution mass spectrometer; accurate mass; line shape calibration; elemental composition

在仪器线性轮廓校正技术出现之前, 人们认为单位质量分辨质谱(如四极杆质谱)是不能实现准确质量数测定的。两方面原因导致了单位质量分辨质谱不能测定准确的质荷比, 一是质谱仪器系统得到失真和不对称的质谱峰形, 二是单同位素峰与¹³C峰存在重叠。前者使得采用传统的质心处理方法很难确定质谱峰中心, 而后者由于重叠引起的干扰而引入了额外的质量测定误差。传统的质谱校正只针对 m/z , 并没有针对质谱峰形, 而质谱峰形的校正对于可靠的质荷比测定及元素组成的确定也是至关重要的。Cerno Bioscience公司开发的仪器线性轮廓校正技术——MassWorksTM, 使这两个问题得到了解决。这种独特的校正技术提供了更全面的质谱校正, 不仅针对确切的 m/z 值, 更为重要的是对质谱峰形的校正。MassWorksTM把质谱峰形函数校正为已知的数学峰形函数(这个峰形函数是可以根据已知标定离子的理论质量数和同位素分布推导出来), 通过实际的谱图与理论的谱图在数学上的对

作者信息: 李斌, 男, 技术工程师, bin_li@lumtech.com.cn

比，任何质量漂移以及峰形失真都可以得到校正并归纳为一个校正函数^[1]，从而得到拥有完美数学定义的以及对称的质谱峰形，这使得重叠峰的解卷积运算和准确质心的确定变得简单，进而使得在单位质量分辨质谱上实现化合物质量准确质量测定成为现实^[2-6]。

本文将以分析工作者常见的四极杆GC/MS和LC/MS为例，介绍MassWorksTM在四极杆质谱上通过质量校正测定准确质量的方法，并对质量准确度的可靠性进行评价。

1 GC/MS自动质量校正获得准确质量

四极杆质谱上要实现准确质量测定的关键在于质谱峰形函数的校正过程，这个峰形函数是根据已知标定离子的理论质量数和同位素分布推导出来的。质谱的校正气—全氟三丁胺（PFTBA）具有采集方便、碎片离子质量丰富的特点，可直接选作为准确质量测定的标准物质，准确质量测定的工作流程见图1。

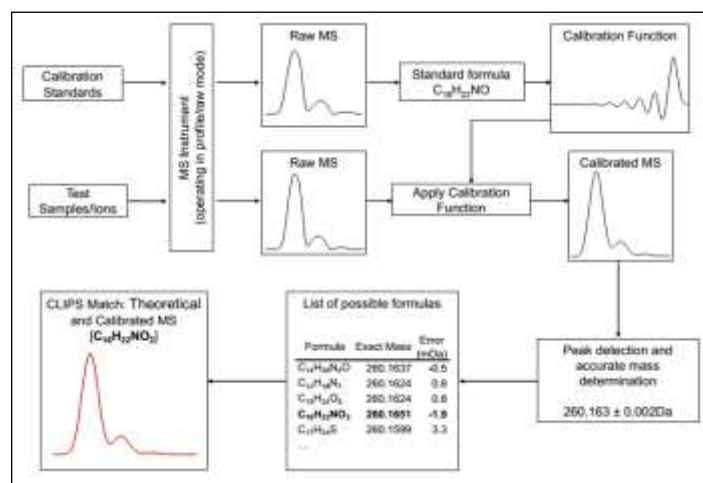


图1 MassWorksTM的工作流程

选用Agilent 5977 GC/MS系统作为采用MassWorksTM的Autocal自动质量校正功能，采用PFTBA作为校正内标，评价Agilent 单位质量分辨的GC/MS测定化合物准确质量的准确性、稳定性和可靠性，为给定的Agilent GC/MS系统提供一种标准、简便、快捷的准确质量测定方法。

在Agilent 5977 GC/MS系统上，将浓度为 100 和 500 pg/μl八氟萘（OFN）的 2,2,4- 三甲基戊烷溶液分别进样10次，以评价采用MassWorksTM的Autocal自动质量校正功能获得准确质量的可行性、准确性及稳定性。色谱柱为Agilent的J & W HP-5ms超高惰性气相色谱柱（30m×0.25mm×0.25 μm）。以PFTBA作为内标校正标准物与待测物在同一次运行中采集，所有MS数据采用原始扫描（profile格式，每个质谱峰大约10个测量）采集模式，仪器阈值设置为0，质量扫描范围50~00m/z，采样速率为2 ^3。

采用MassWorksTM 4.0版本（Cerno Bioscience公司，美国）处理质谱数据，4.0版本的Autocal

功能自动校正获取目标物的准确质量,无需繁琐的人工校正过程。根据选择的质量扫描范围,PFTBA的系列离子会被自动选为校准离子。当前的数据校正采用的是碎片离子CF₃、C₂F₄、C₂F₅、C₃F₅、C₃F₇、C₄F₉、C₅H₁₀N, m/z 分别为 69、100、119、131、169、219、264。图2为PFTBA的校正结果,结果显示各个标准离子的校正质量误差小于 2.5mDa,校正谱图与理论谱图的谱图准确度在99%以上。

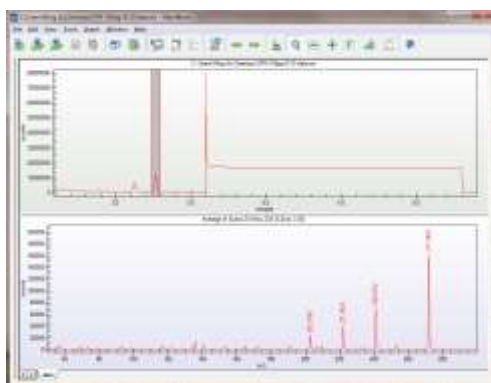


图2 OFN、PFTBA的总离子流图(上)和OFN的平均质谱图(下)

OFN的分子离子为m/z 271, OFN在100 pg/μl时观察到最丰富的离子与离子绝对计数大约170000(图2, 下图)。表1为各样品的精确质量10次测量结果, OFN的分子离子m/z271, 在100和500pg 时的平均质量误差可达到-1.5 mDa (-5.6 ppm) 和 -0.8 mDa (-3.0 ppm)的高质量精度。

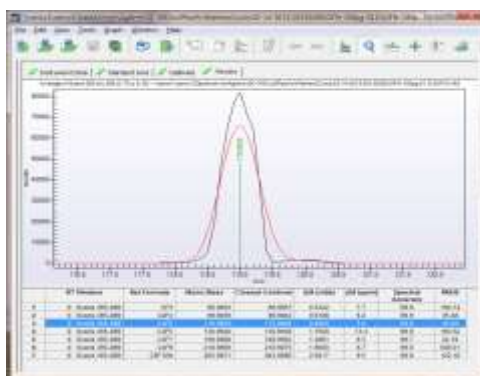


图3 PFTBA的原始谱图(黑色)与校正谱图(红色)

表1 OFN的准确质量和谱图准确度

Sample #	Mass Error		Spectral Accuracy (%)	
	500 pg	100 pg	500 pg	100 pg
1	-1.4	-1.8	99.75	99.37
2	-0.9	-2.3	99.82	99.17
3	0.1	-0.9	99.48	99.13
4	1.0	-1.0	99.58	99.47
5	-1.2	0.8	99.89	99.34
6	-1.0	-1.0	99.84	99.31
7	-2.5	-4.5	99.71	99.59

8	-0.2	-0.7	99.73	99.20
9	-1.5	-1.3	99.81	99.15
10	-0.4	-2.2	99.57	99.29
Average	-0.8	-1.5	99.7	99.3
StDev	0.97	1.38	0.13	0.15
%RSD	-1.18	-0.91	0.001	0.001

当前的研究表明，在Agilent 5977 GC/MS系统上，通过线性轮廓校正技术，可提高约100倍的质量精度，极大地改善了单位质量分辨率质谱仪指定的质量准确度，使得四极杆质谱解析化合物元素组成成为现实。另外，这种线性轮廓校正技术也可作为一个基准，以评价Agilent5977 GC / MS以及其他GC/MS系统的质量精度性能。

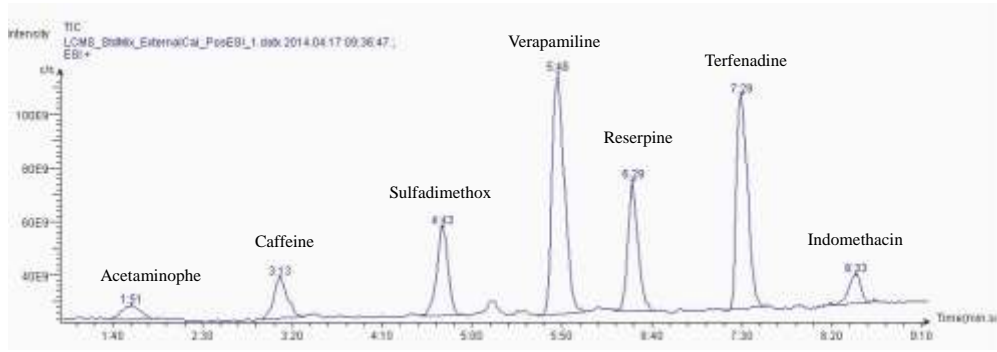
2. 四极杆LC/MS质量内校正和外校正测定目标物的准确质量

无论是天然产物、还是合成药品中少量的杂质以及非法添加物鉴定的第一步就是测定这些目标物的准确质量，并确定元素组成。由于市售四极杆的LC/MS没有类似于高分辨TOF的准确质量测定功能以及类似于GC/MS的商业质谱谱库，因而定性能力受到了极大的制约。MassWorks™线性轮廓校正技术可以提升四极杆质谱100倍的质量测定精度，得到接近于TOF的分析结果，全面扩展低分辨液质的定性功能。

此次将以紧凑型质谱仪 Expression CMS（Advion公司，美国）为例，考察MassWorks™在四极杆LC/MS上测定目标物的准确质量的准确确定。Agilent ESI 调谐混标 G2421（见图4）被作为内标（通过柱后注射方式引入与待测物同时采集）或外标校正物质（通过注射进样方式与待测物分开采集），测定的目标物分别为咖啡因、特非那定、对乙酰氨基酚、磺胺二甲氧嘧啶、维拉帕米、利血平、吲哚美辛（见图5）。



图4 Agilent ESI 调谐混标 G2421



液相: X-LC 3000 UHPLC; 质谱: expression CMS; 色谱柱: Agilent Zorbax XDB-C18 (2.1×50mm, 5 μm)

流动相: A (0.1% 甲酸水溶液), B (0.1% 甲酸甲醇溶液); 进样量: 10 μL; 流速: 0.25 ml/min

梯度: 10% B (0~9min) → 90% B (9~10min) → 10% B (10~12min)

ESI 电离模式: Positive; 电离电压: 3500V; 毛细管电压: 180V; 脱气温度: 300°C; 毛细管温度: 250°C

图5 待测目标物的总离子流图

结果表明, 质谱数据经MassWorks™校正处理后, 内标和外标校正离子的校正质量误差均小于5mDa, 谱图准确度准确度大于99% (见图6、7)。内标法测定的目标物质量误差要明显小于外标法 (见表2), 它能提供更好的质量精度, 以减少待选分子式的数量, 提供更为准确的分子式鉴定结果, 此次7种目标物分子式的内标测定结果均排在第1位。

这种准确质量测定方法为广大分析工作提供一种经济、准确、可靠的LC/MS定性方法, 而不必借助昂贵的高分辨LC/MS系统。但如果要追求更高的质量准确度, 选择内标校正方法是更理想的选择, 这样可以尽量减小质谱系统波动的影响。

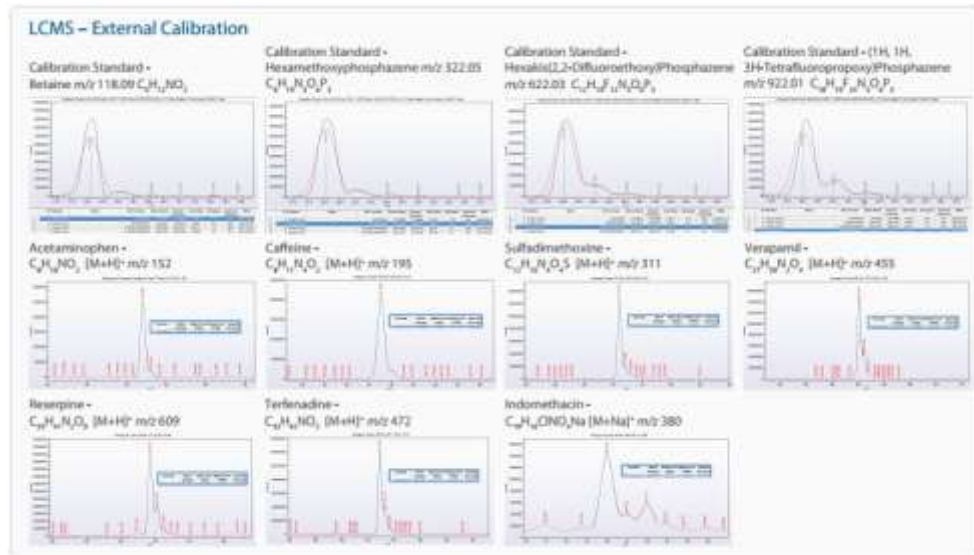


图6 外标校正结果以及目标物的测定结果

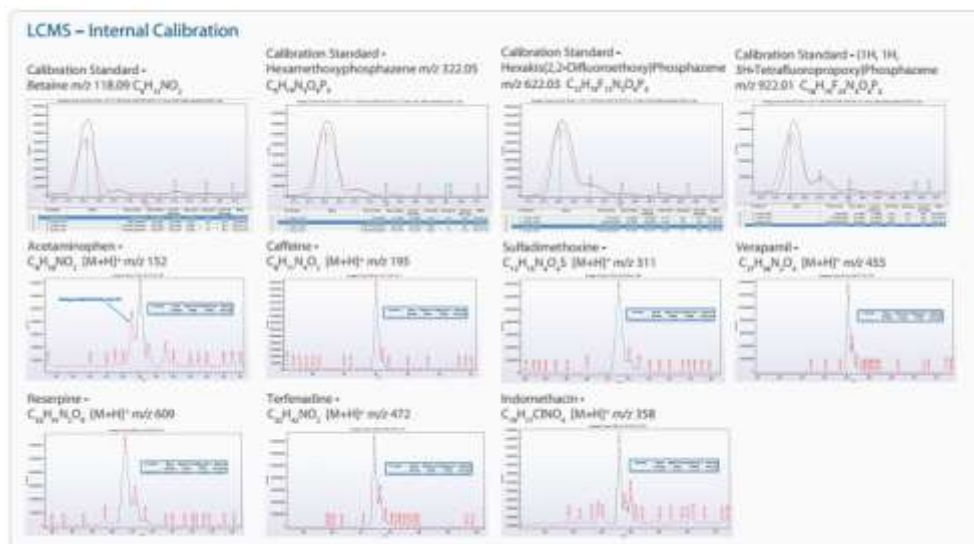


图7 内标校正结果和目标物的测定结果

表2 内标校正与外标校正结果的对比

Compound	External Calibration (mDa)	Internal Calibration (mDa)
Acetaminophen	-9.35	-1.85
Caffeine	-21.30	-7.10
Sulfadimethoxine	11.20	-7.00
Verapamil	55.28	15.28
Reserpine	26.81	-14.79
Terfenadine	42.05	8.75
Indomethacin*	54.06	13.61

* 吲哚美辛内标法测定的目标离子为 $[M+H]^+$ ，外标法为 $[M+Na]^+$

3. 通过质量准确度和谱图准确度鉴定色谱共流出物

目前四极杆的GC/MS主要是依靠谱库检索（如NIST、Willy等）和保留时间定性未知化合物，但当目标物色谱分离效果不佳时，往往匹配率会大打折扣，这时谱库检索定性的结果就会有很大不确定性^[7]。图8为食品工业中广泛使用的一种干粉的SPME-GC/MS谱图，其丰富的风味物质导致了如此复杂的总离子流图，在 $RT = 11.52 \text{ min}$ 有一组共流出化合物（图8右上），观察到主要的离子为 $m/z 150$ 、 122 和 108 （图9a）。NIST谱库检索显示最可能的匹配结果为1-(5-(2-Methyl-1-propyl)-2-pyrazinyl)-1-propanone（图9b， $C_{11}H_{16}N_2O$ ， $m/z 192$ ），但其正向检索匹配仅为656，反向检索匹配为613，这样的结果可信度太低。

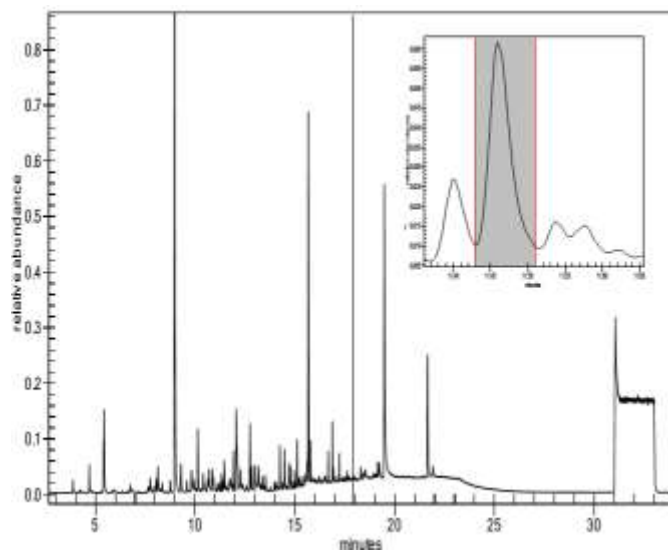


图8 干粉与PFTBA的总离子流图

(仪器: TSQ8000 GC-MS/MS; 色谱柱: TG-WaxMS (60m×0.25mm×0.5 μm))

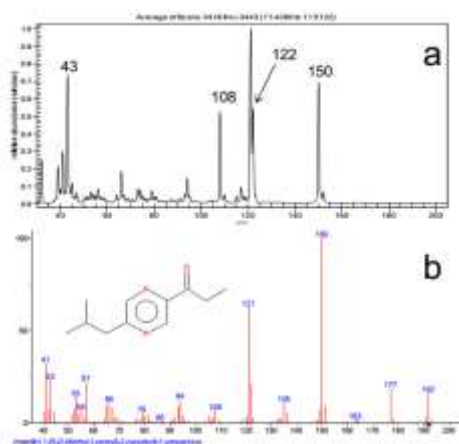


图9 共流出物的NIST检索结果

表3 m/z 150的MassWorks分析结果

Row	Formula	Mono Isotope	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)	Spectral Accuracy (%)	RMSE	DBE
1	C6H14S2	150.0531	15.6	103.7	96.8	10814	0
2	C5H12NO2S	150.0583	10.4	69.1	96.8	30105	0.5
3	C3H10N4OS	150.057	11.7	78.1	96.7	30757	1
4	C4H12N3OS	150.0696	-0.9	-5.7	96.7	30928	0.5
5	C6H14O2S	150.0709	-2.2	-14.7	96.6	31307	0
6	C3H12N5S	150.0808	-12.1	-80.6	96.6	31841	0.5
7	C5H14N2OS	150.0821	-13.4	-89.5	96.6	31857	0
8	C2H10N6S	150.0682	0.5	3.2	96.6	31914	1
9	CH8N7S	150.0556	13.1	87.0	96.5	32720	1.5
10	C9H10S	150.0498	18.9	126.1	95.1	45615	5
11	C3H8N3O4	150.0509	17.8	118.4	94.5	51153	1.5
12	CH6N6O3	150.0496	19.1	127.3	94.5	51261	2
13	CSH10O5	150.0523	16.4	109.5	94.4	51830	1
14	C2H8N5O3	150.0622	6.5	43.5	94.4	51852	1.5
15	H6N8O2	150.0608	7.9	52.5	94.4	52154	2

利用MassWorksTM对质谱数据进行再处理, PFTBA被作为校正标准物校正质谱数据, 最终测得m/z 150离子的准确质量数为150.0684 Da, 通过CLIPS检索得到的该离子的分子式结

果（见表3）。分子式 $C_6H_{14}S_2$ 的谱图准确度高达98.8%，排在所有分子式的第1位，其理论谱图与校正谱图完全匹配（见图10），说明了 $C_6H_{14}S_2$ 即为 m/z 150的分子式。 m/z 122和108的元素组成最终的分析结果分别为 $C_3H_8S_2$ 和 $C_7H_{10}N_2$ （均排在第1位），谱图准确度均为98.1%。

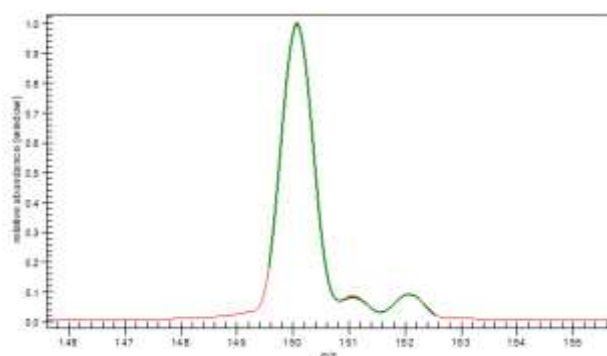


图10 $C_6H_{14}S_2$ 的理论谱图（红色）与校正谱图（绿色）的匹配

将 $C_6H_{14}S_2$ 输入至NIST谱库检索结果，共得到13个化合物，其中10个化合物由于不含特征离子 m/z 108而被排除，在剩余的3个结果中，只有Diisopropyl disulfide与共流出谱图在 m/z 43、108和150处具有相似的丰度比。采用同样的方式， $C_7H_{10}N_2$ 被确定为2-Ethyl-6-methyl pyrazine。通过图5中各个谱图的对比，可以确定共流出组分（图11 c）是Diisopropyl disulfide（图11a）与2-Ethyl-6-methyl pyrazine（图11 b）混合图谱。通过MassWorksTM的线性轮廓校正技术测定准确分子量，并通过反映分子指纹信息的谱图准确度确定共流出物中各离子元素组成的方法，弥补了GC/MS谱库检索定性的不足，两中方法结合使用可得到更为准确可靠的定性结果。

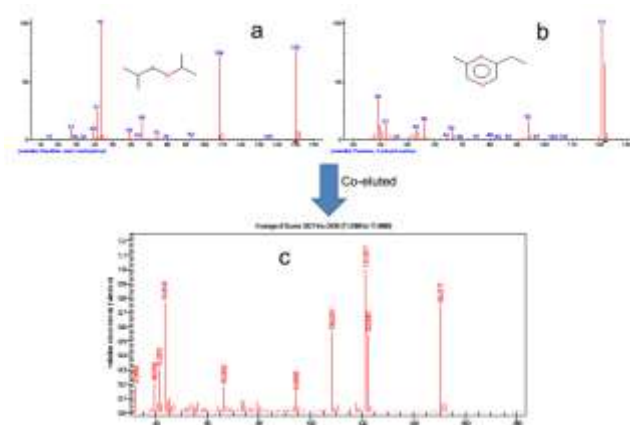


图11 共流出物的鉴定：Diisopropyl disulfide与2-Ethyl-6-methyl pyrazine

结论

MassWorksTM的线性轮廓谱图校正技术提高了单位质量分辨质谱100倍的质量测定精度，质量数准确至0.00x Da，使得低分辨质谱获得了类似于高分辨质谱的准确质量测定和元素组成解析功能，拓展了四极杆质谱定性潜力。即使不借助高分辨质谱，也能获得目标化合

物准确的分子质量和分子式信息。同时，也为食品安全、香精香料、药物杂质、环境未知物的鉴定提供了一种准确、经济、简单的定性方法。

参考文献:

- (1) Wang, Y., Gu, M. *Anal. Chem.*, **2010**, 82: 7055.
- (2) Y. Wang, H. Press. *Chromatogr. Jpn.*, **2006**, 27: 135.
- (3) Chen, J., Gu, M., Wang, Y., Kuehl, D. *LCGC* Sept 1, **2008**.
- (4) Ochiaia, N., Sasamotoa, K., MacNamarab, K. *Journal of Chromatography A*, **2012** 1270: 296
- (5) Mick, J, Gillespie, T. Indianapolis, June 3-7: **2007**
- (6) Chen, J., Sparkman, O.D., Gu, M. in *Proceedings of the 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Philadelphia, May 31-June 4: **2009**
- (7) Zhou, W., Zhang, Y., Xu, H. and Gu, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, 25: 3097