

# 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<sup>1</sup>, 欧阳伟民<sup>1</sup>, 顾鸣<sup>2</sup>, 王永东<sup>2</sup>

(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), 质荷比的测定仅仅只能准确到 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——MassWorks™, 它不仅校正质量轴, 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

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<sup>13</sup>C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以至于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——MassWorks™, 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。MassWorks™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<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2-6]</sup>。

本文将分析工作者常见的四极杆GC/MS和LC/MS为例, 介绍MassWorks™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。

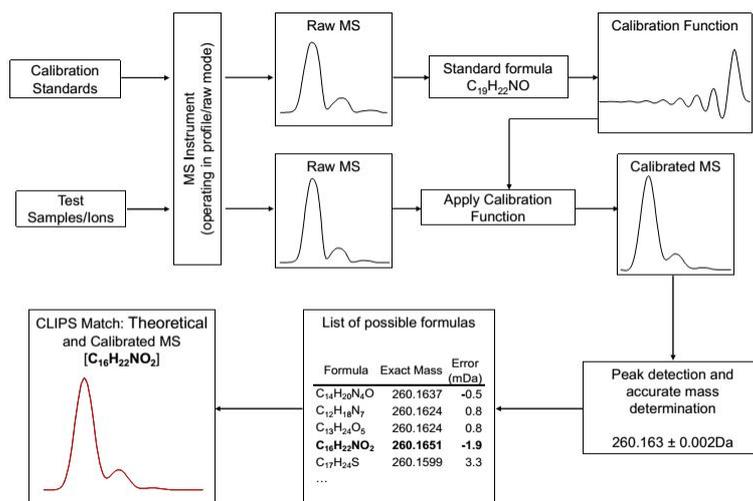


图1 MassWorks™的工作流程

选用Agilent 5977 GC/MS系统作为采用MassWorks™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 - 三甲戊烷溶液分别进样10次，以评价采用MassWorks™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<sup>^</sup>3。

采用MassWorks™ 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CF<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>F<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>、C<sub>3</sub>F<sub>5</sub>、C<sub>3</sub>F<sub>7</sub>、C<sub>4</sub>F<sub>9</sub>、C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N，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。

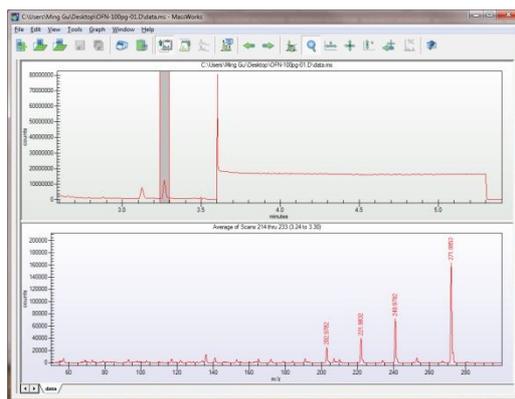


图2 OFN、PFTBA的总离子流图（上）和OFN的平均质谱图（下）

OFN的分子离子为 $m/z$  271，OFN在100 pg/ $\mu$ l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 $m/z$ 271，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。

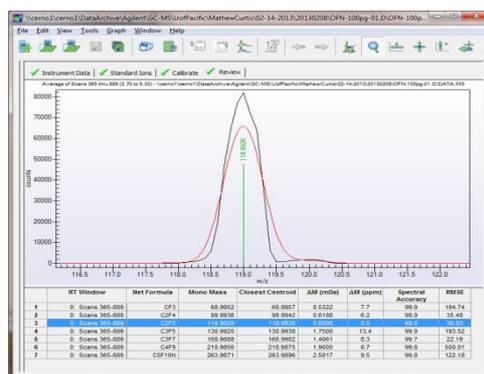


图3 PFTBA的原始谱图（黑色）与校正谱图（红色）

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）。

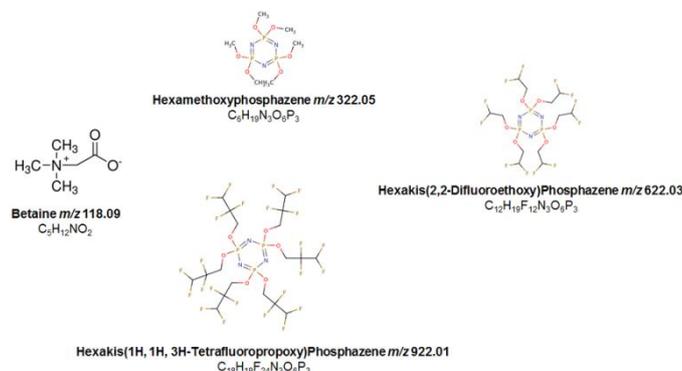
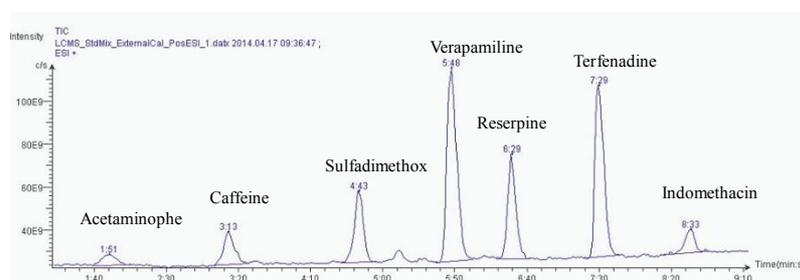


图4 Agilent ESI 调谐混标 G2421



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

流动相: A (0.1%甲酸水溶液), B (0.1%甲酸甲醇溶液); 进样量: 10μL; 流速: 0.25ml/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℃; 毛细管温度: 250℃

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。

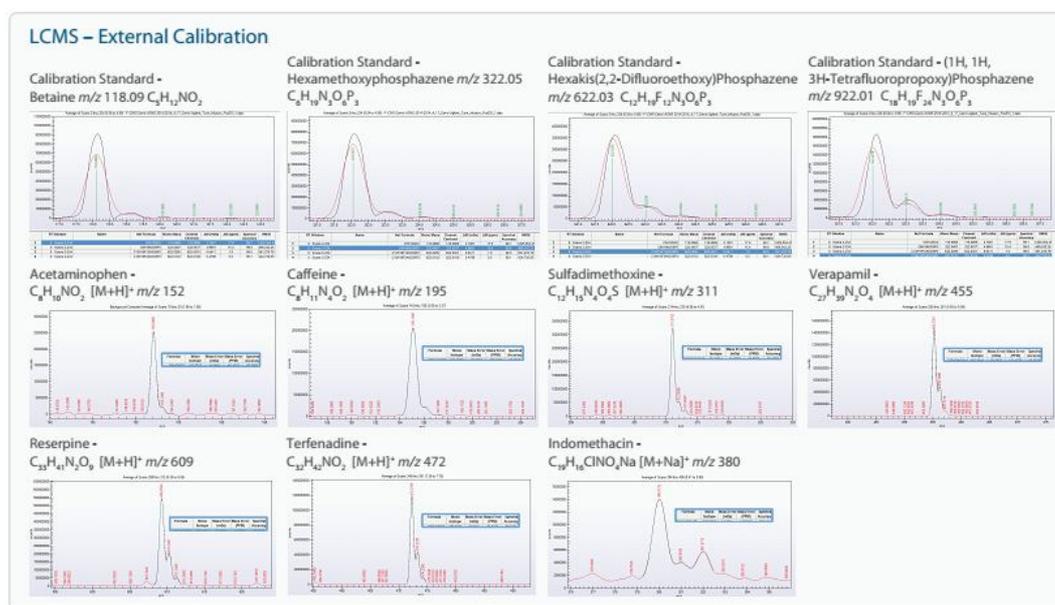


图6 外标校正结果以及目标物的测定结果

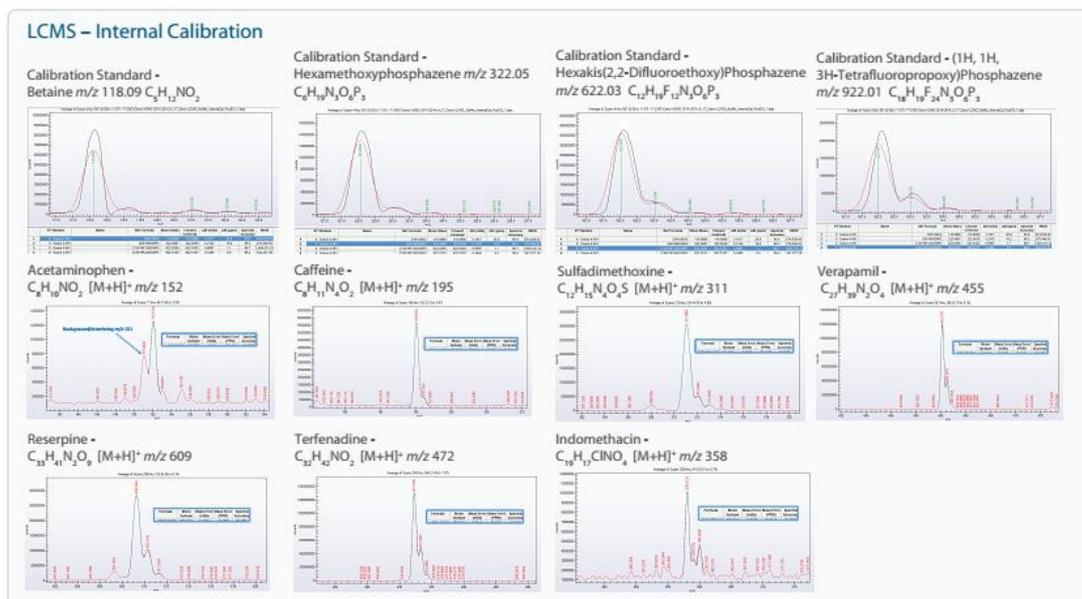


图7 内标校正结果和目标物的测定结果

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

\* 吡喹酮内标法测定的目标离子为[M+H]<sup>+</sup>，外标法为[M+Na]<sup>+</sup>

### 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<sup>[7]</sup>。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 min有一组共流出化合物（图8右上），观察到主要的离子为m/z150、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<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O，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。

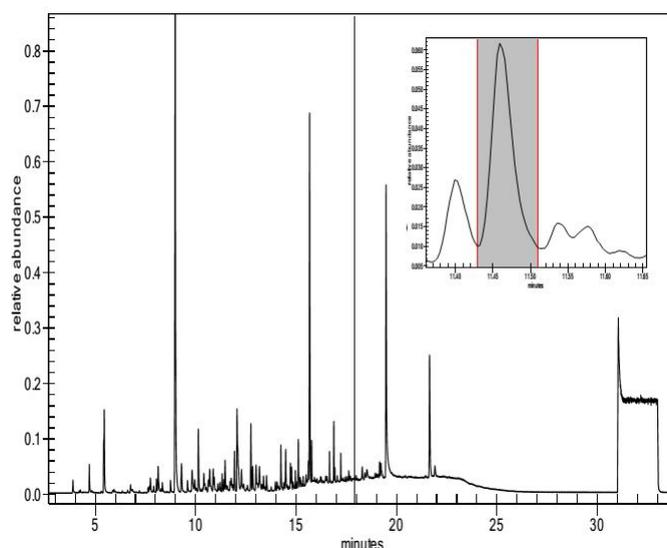


图8 干粉与PFTBA的总离子流图

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

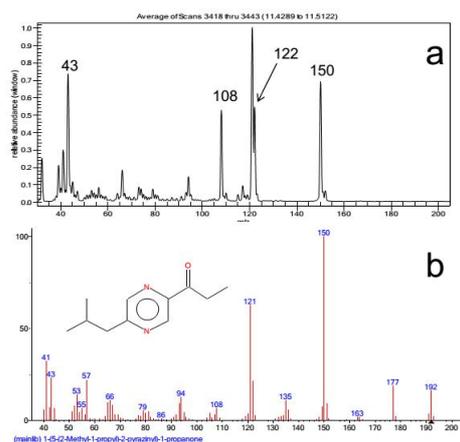


图9 共流出物的NIST检索结果

利用MassWorks<sup>TM</sup>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<sub>6</sub>H<sub>14</sub>S<sub>2</sub>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<sub>6</sub>H<sub>14</sub>S<sub>2</sub>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<sub>3</sub>H<sub>8</sub>S<sub>2</sub>和C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>（均排在第1位），谱图准确度均为98.1%。

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	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> S <sub>2</sub>	150.0531	15.6	103.7	98.8	10814	0
2	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub> S	150.0583	10.4	69.1	96.8	30105	0.5
3	C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	150.057	11.7	78.1	96.7	30757	1
4	C <sub>4</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	150.0696	-0.9	-5.7	96.7	30928	0.5
5	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S	150.0709	-2.2	-14.7	96.6	31307	0
6	C <sub>3</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> S	150.0808	-12.1	-80.6	96.6	31841	0.5
7	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	150.0821	-13.4	-89.5	96.6	31857	0
8	C <sub>2</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub> S	150.0682	0.5	3.2	96.6	31914	1
9	CH <sub>8</sub> N <sub>7</sub> S	150.0556	13.1	87.0	96.5	32720	1.5
10	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> S	150.0498	18.9	126.1	95.1	45615	5
11	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	150.0509	17.8	118.4	94.5	51153	1.5
12	CH <sub>6</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	150.0496	19.1	127.3	94.5	51261	2
13	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	150.0523	16.4	109.5	94.4	51830	1
14	C <sub>2</sub> H <sub>8</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	150.0622	6.5	43.5	94.4	51852	1.5
15	H <sub>6</sub> N <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	150.0608	7.9	52.5	94.4	52154	2

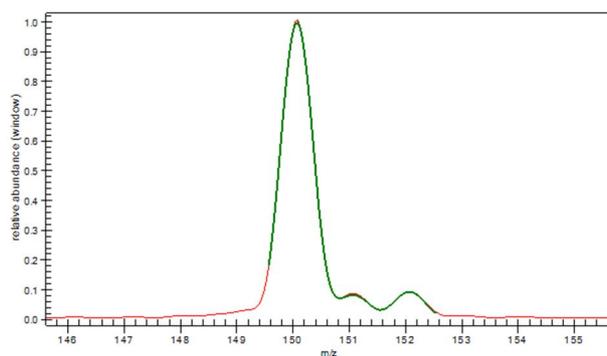
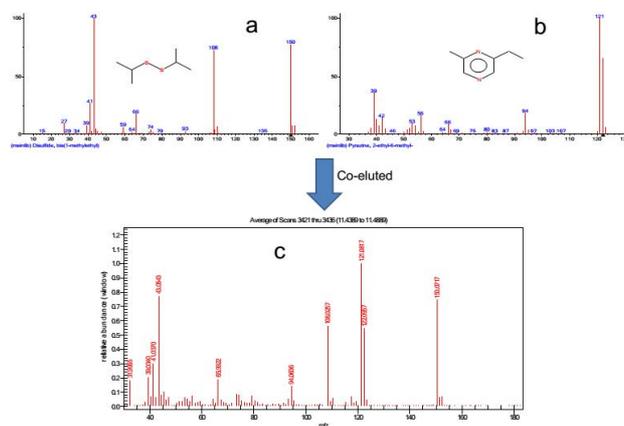


图10 C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>S<sub>2</sub>的理论谱图（红色）与校正谱图（绿色）的匹配

将C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>S<sub>2</sub>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<sub>7</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>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MassWorks™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。



(7) Zhou, W., Zhang, Y., Xu, H. and Gu, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, 25: 3097