

## 单四极杆 GC-MS 系统进行分子式测定的校正稳定性

顾明、王永东

发表于 [www.spectroscopyonline.com](http://www.spectroscopyonline.com) May 2008 *Current Trends In Mass Spectrometry* 25

**一个新的校正方式，包括校正质量准确度和谱图准确度，能够在传统的单四极杆气相色谱-质谱上进行分子式测定，稳定性研究表明，这样完美校正方式和相关的分子式检测是足够稳定的，可以保持一周而不需要再校正。**

EI广泛用于气相色谱-质谱 (GC-MS)，在EI过程中，分子离子常常被碎裂成多个碎片离子，尽管样品所测得的质核比 ( $m/z$ ) 和谱库比较仅有 $\pm 0.5$  Da准确度，但这些EI碎片离子通过谱库检索 (如NIST) 可以提高MS的化合物识别能力，因此，EI谱库检索已经成为GC-MS化合物识别的选择方法。虽然该方法可以很好地满足一些日常应用，但如果很多化合物具有相似的高检索分数时，化合物识别就变得含糊不清了。在一些苛刻应用中，如杂质和降解物识别，药物、化学品、食品和香精、香料行业中的活性组分测定，这些不明化合物可能不在谱库中，因此，这类应用就需要高分辨质谱系统如GC-TOF测量精确质量数，这类仪器是非常昂贵的，而且需要更高的维护费用。精确质量测定可以进一步确定谱库搜索结果，或通过分子离子及重要的碎片离子确定元素组成。

在另一篇文章中，Chen及其团队<sup>[1]</sup>报道了通过新的校正方式，精密地校正了 $m/z$ 和质谱的线形谱图，在传统四极杆GC-MS系统上实现了极高的精确质量测定。由于这个精密设计的校正方式涉及质量准确度和谱图准确度，关于这个校正及其实际应用的稳定性问题随之出现。

本文针对传统单四极杆GC-MS系统元素组成识别的影响因素，质量准确度和谱图准确度两个方面，设计一个校正稳定性研究程序并将结果展现给大家。

### 原理

传统的质谱校正仅确定质量数，而不考虑仪器线形谱图，仪器线形谱图大大影响质量数测定，特别是在单位质量分辨仪器如四极杆GC-MS系统。开发的新校正方式<sup>[2, 3]</sup>不仅校正了质量轴，而且也校正了仪器的线形谱图，由于质谱的理论峰位 (它们是相关离子的质量和) 可以非常准确的知道，另外，我们也可以准确地知道不同同位素及其丰度，通过这些信息可以计算出校正函数，不但校正峰的位置，而且也校正仪器的线形谱图。

实际仪器的线形谱图常常是未知且很难定义，通过这个新技术校正后，变成对称且可用数学表达的线形函数，这就大大提高了后续处理能力，包括在单四极杆GC-MS仪器上精确质量数测定能力。通常来说，利用报告的精确质量信息，在一定的质量偏差内，通过搜索全部可能的化学分子式可以确定元素组成。依赖仪器内在的质量准确度，在质量偏差范围内得到的分子式均为可能的分子式，如质量准确度达到1 ppm的仪器，对于500 Da的化合物，限定元素为C、H、N、O、S和Cl时，待选的化合物有34个。

众所周知，每个唯一分子式具有唯一的同位素分布，理论上来说，这个同位素分布可作为分子式识别的附加信息。以前，这个方式用于分子式识别被认为是不可行的，因为很难在给定的仪器上将同位素轮廓图校正到高于98%的谱图准确度<sup>[4]</sup>，这就限制了使用同位素轮廓图信息，帮助我们减少通过精确质量测定得到的待选化合物数量。然而，如果谱图准确度能够提高到99%以上，它就能在精确质量数得到可能分子式列表中识别出唯一的分子式，或在不定期校正的仪器上测定确定的分子式，只要能保证相对较高的质量精度。

利用前面描述的仪器校正线形函数，列表中每个待选化合物的理论质谱图可以准确计算出来，并将其分别与先前校正的测量质谱图比较，高于99%的谱图准确度值被计算出来，用于反映

---

### 北京绿绵科技有限公司

北京市北四环西路 68 号左岸工社 806-807 室  
(100080)  
Tel: 010-8267 6061/2/3/4/5/6/7  
Fax: 010-8267 6068

沈阳市和平区南一马路力创大厦 503 室  
(110001)  
Tel: 024-2387 9100/2387 8588/2387 3099  
Fax: 024-2387 6558

杭州市天目山路 224 号中融城市花园 6 幢 2 单元 702 室 (310012)  
Tel: 0571-8765 8020/8717 8257  
Fax: 0571-8717 8257

两者微小且基本不同，然后对给出分子式的可能性进行排名，这个过程叫做校正的线形同位素轮廓搜索（CLIPS），已经证明，CLIPS对于分子式测定优于质量准确度。

## 实验

全氟三丁胺（PFTBA）校正标样和样品混合物在 Agilent 5973 GC-MS 单四极杆系统上测试一周，PFTBA 标样通过注射法测试一次，且在一周后实验结束时重复测试一次，混合样品在两次 PFTBA 运行中间，以不同浓度分析 22 次，在这个分析过程中，利用 MassWorks CLIPS (Cerno Bioscience, Danbury, Connecticut)测试盲样（名义质量数  $m/z$  162）并确定其元素组成。PFTBA 和混合样品在相同 MS 条件，“raw”模式（非峰检测，有时叫做轮廓模式）、质量范围为 50-550  $m/z$  且离子阈值为零下采集。

利用第一次 PFTBA 运行的八个已知碎片离子，校正全部 22 次 GC-MS 运行，并计算盲样的精确质量数并确定元素组成，这个校正也应用到第二次 PFTBA 运行，测定同样八个碎片离子的精确质量，以测定两次 PFTBA 运行期间的质量漂移。

## 结构和讨论

图 1 显示了第一次 PFTBA 运行的总离子流图，0.8 min 的保留时间窗口用于校正前的谱图平均。图 2 显示了校正离子  $C_3F_5^+$  校正前后的轮廓模式质谱图，表明虽然经过很好的调谐，但质谱的轮廓图没有已知且可定义的峰形，而校正后的谱图具有已知且可用数学表达的峰形，校正的质谱图也根据校正离子的单同位素质量平移到正确的位置。由于惯例且不失通用性，本文中得失电子的质量差异被忽略，其正确的质量与其离子中性形式一致。

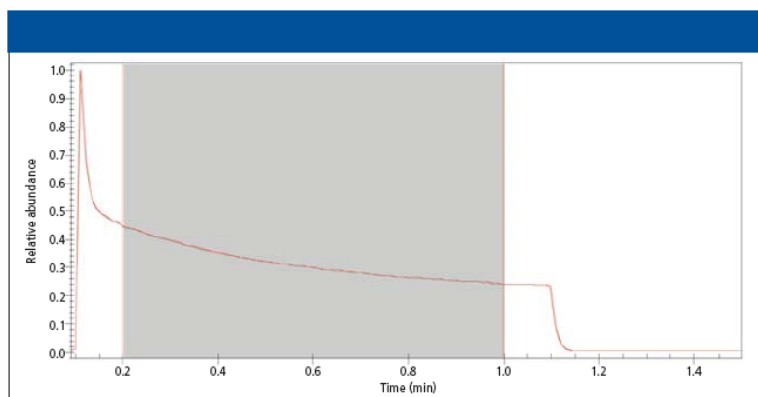


图 1. 第一次 PFTBA 校正气运行的总离子流图

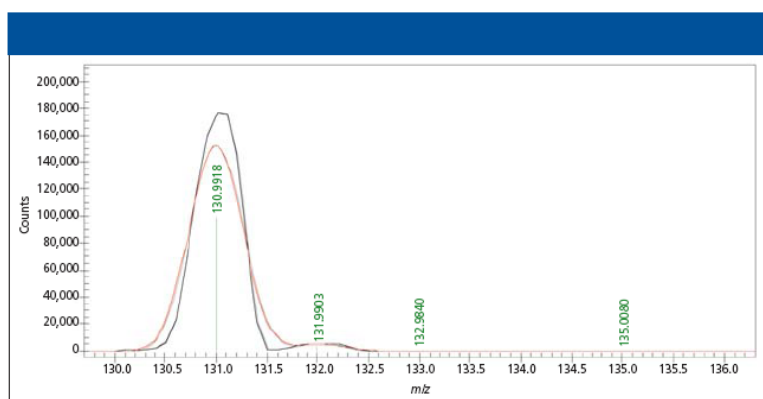


图 2. PFTBA校正离子 ( $C_3F_5^+$ ) 校正前 (黑) 后 (红) 的质谱数据

## 北京绿绵科技有限公司

北京市北四环西路 68 号左岸工社 806-807 室  
(100080)  
Tel: 010- 8267 6061/2/3/4/5/6/7  
Fax: 010- 8267 6068

沈阳市和平区南一马路力创大厦 503 室  
(110001)  
Tel: 024- 2387 9100/2387 8588/2387 3099  
Fax: 024- 2387 6558

杭州市天目山路 224 号中融城市花园 6 幢 2 单元 702 室 (310012)  
Tel: 0571- 8765 8020/ 8717 8257  
Fax: 0571- 8717 8257

这个校正被应用在一周后的第二次 PFTBA 运行上，表 I 列出了同样八个校正离子的精确质量数，可以发现全部这些离子的系统质量漂移约+7 mDa，折合为 12- 54 ppm，这个误差用于传统的单一同位素质量搜索确定元素组成常常认为是太大的。

表 I. 最后一天校正离子 PFTBA 数据采集处理后得到的精确质量数

Calibration ions	Exact mass (Da)	Accurate mass (Da)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)
C <sub>3</sub> F <sub>5</sub>	130.9920	130.9989	6.9	52.7
C <sub>3</sub> F <sub>7</sub>	168.9888	168.9980	9.2	54.4
C <sub>4</sub> F <sub>9</sub>	218.9856	218.9931	7.5	34.2
C <sub>5</sub> F <sub>10</sub> N	263.9871	263.9929	5.8	22.0
C <sub>7</sub> F <sub>14</sub> N	363.9807	363.9889	8.2	22.5
C <sub>8</sub> F <sub>16</sub> N	413.9775	413.9849	7.4	17.9
C <sub>9</sub> F <sub>18</sub> N	463.9743	463.9806	6.3	13.6
C <sub>9</sub> F <sub>20</sub> N	501.9711	501.9772	6.1	12.2

同样的校正应用到一周内的22次GC-MS运行，图3画出了  $m/z$  162 离子的精确质量、离子信号强度以及校正后测定出盲样（烟碱，C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>）的真实质量，该图在质量误差和信号强度之间展现了很明显的相关性，这个结果也同文献<sup>[5]</sup>预测和得到的结果一致。对于强度大于8000 counts，精确质量与真实质量的偏差在几mDa以内，这也同表I估算的整个质量漂移一致，确定两次PFTBA运行所观察到的整个质量漂移程度相当于相同离子强度重复测试的随机波动。换句话说，整个系统的~7 mDa质量漂移误差，相对质量测量本身的随机波动是没有统计意义的（第一次PFTBA校正应用到全部22次GC-MS运行，不会造成重大的系统质量测量误差）。

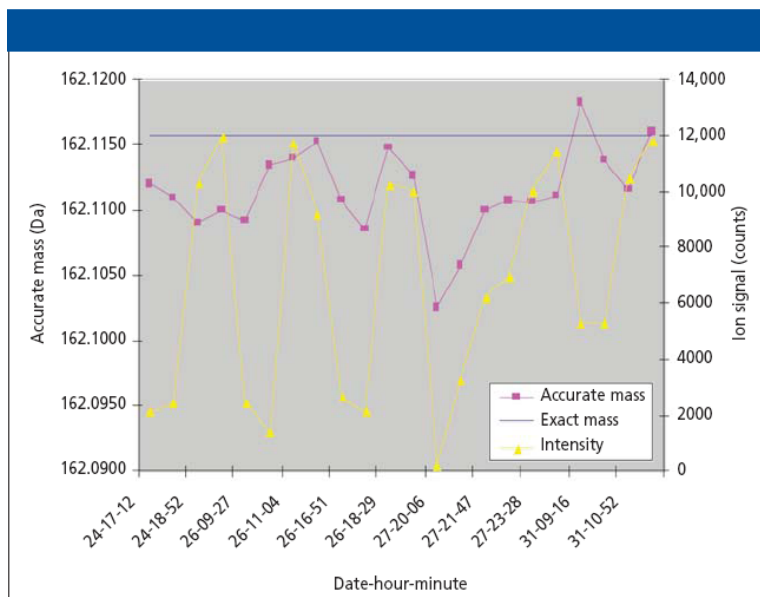


图3. 报告的质量准确度、单同位素峰离子强度和已知  $m/z$  162 Da 的真实质量数

正象文献<sup>[6]</sup>报道，当质量准确度作为分子式识别的重要工具时，通常只识别给定同位素离子的单一同位素峰，由于这个原因，即使具有 1-2 ppm 质量精度的高分辨质谱，在精确测量的很小质量误差内，也有很多待选分子式的单一同位素质量落在这个范围内。谱图准确度，一个独立计量工具，可以计量测定谱图与计算的理论谱图匹配程度，它包含给定离子更多的同位素分布精细结构信息，是比质量准确度更重要的信息。另外，由于代表质谱仪器线形谱图的谱图准确度不容易受质谱波动影响，所以谱图准确度相对质量准确度是更可靠的分子识别工具。

## 北京绿绵科技有限公司

北京市北四环西路 68 号左岸工社 806-807 室  
 (100080)  
 Tel: 010- 8267 6061/2/3/4/5/6/7  
 Fax: 010- 8267 6068

沈阳市和平区南一马路力创大厦 503 室  
 (110001)  
 Tel: 024- 2387 9100/2387 8588/2387 3099  
 Fax: 024- 2387 6558

杭州市天目山路 224 号中融城市花园 6 幢 2 单元 702 室 (310012)  
 Tel: 0571- 8765 8020/ 8717 8257  
 Fax: 0571- 8717 8257

162 Da的未知离子，质量误差超过 50 ppm (表I和图 3)提供了很好的例子，说明谱图准确度相对质量准确度的相对重要性和可靠性。以 162 Da离子为未知物，在通常元素C、H、N、O、F和Cl范围内进行元素组成搜索，全部 22 次质谱测量利用软件对这个离子进行处理测定它们的分子式，根据谱图准确度排名，分子式 $C_{10}H_{14}N_2$ 排名第一位有 19 次，两次排在第二位，一次排在第三位(图 4)，这个分子式后来证明是正确的分子式(烟碱)，排名第二和三的测量均为样品浓度较低的情况下得到。

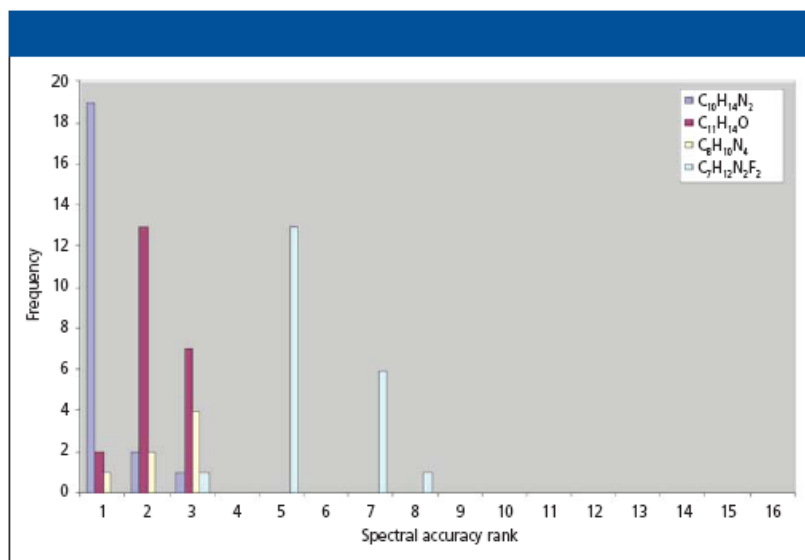


图 4.  $m/z$  162 (烟碱，分子式 $C_{10}H_{14}N_2$ ，真实质量为 162.1157 Da) 离子识别

取三次运行(24-17-12、26-18-29和31-11-40)作为例子与理论计算烟碱质谱图进行叠加(图5)，发现在低浓度运行(24-17-12)时得到好的谱图匹配，在更高浓度运行(26-18-29和31-11-40)得到几乎完美的谱图匹配，这些都反应在相应的谱图准确度这个度量工具上。图5说明谱图准确度直接同离子信号强度(噪音数据)相关，几乎与时间或质量漂移无关，表明谱图准确度不仅是有价值的信息，而且是更可靠的分子式识别手段。

图 5 描绘了 162 Da 烟碱离子的质谱片断，161 Da 质谱峰与烟碱离子具有相同的离子强度，因为 GC-MS 和串联 MS-MS 实验中，在离子化-碎裂过程中常常有其它离子或碎片引起同位素响应叠加，这样的质谱干扰引起 162 Da 离子系统质量测量误差，图 3 的负质量测量偏差就是充分证据。但这不会影响计算的谱图准确度，因为  $m/z$  161 Da 离子通过构建 M-H 离子也被增加到 CLIPS 计算列表中，这里 M 代表需要元素组成测定的未知 162 Da 离子。原理上讲，相似于 161 Da 的更多干扰离子可以处理，虽然仅可以同时处理两个干扰离子。

虽然这里使用的单四极杆 GC-MS 系统，在一周测试期间只有 7 mDa 或 162 Da 超过 50 ppm 的质量波动，但对于传统的精确质量测定元素组成会造成很大偏差，在一周的测试期间，反应质谱线形谱图的质量准确度保持不变，不需重新校正就能不断地进行分子式的可靠测定。

## 结论

稳定性研究表明，这种通过质量准确度和谱图准确度的精密校正的分子式识别方式不受时间波动的影响，另外，分子式测定方式通过分为质量准确度和谱图准确度保证其可靠性。在一周测试期间，质量准确度波动约 7 mDa，而质谱仪器的线形谱图或谱图准确度变化很小，可以不需重新校正实现分子式的可靠测定，这是通过利用 CLIPS 内置的真实同位素处理过程实现的，通过开发给定离子整个同位素分布的精细结构，而不是仅仅依赖单一同位素峰的精确质量数来实现的。

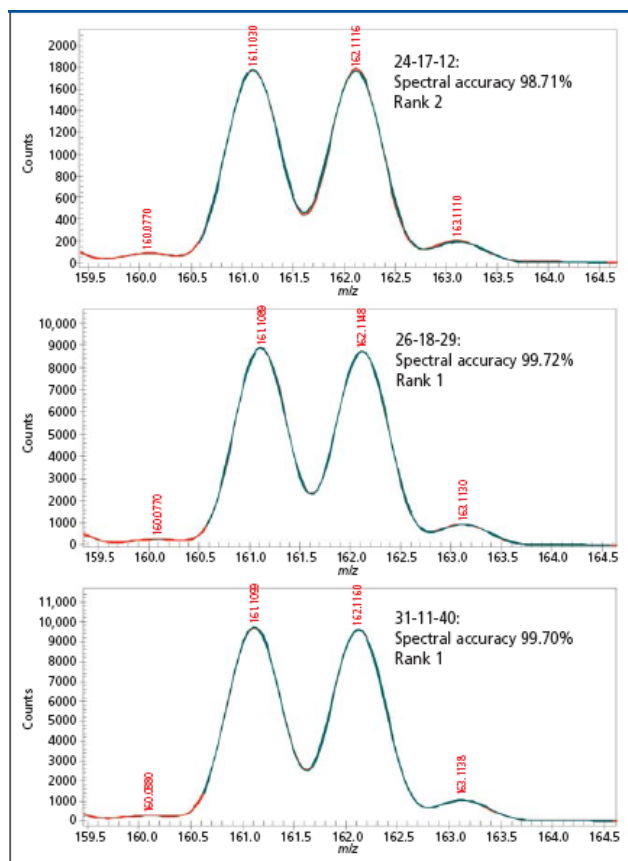


图 5. 校正质谱图（红色）与 $C_{10}H_{14}N_2$ 理论质谱图（青色）的叠加图（上部为第一天实验、中间为两天后实验、底部为一周后实验数据）

#### 参考文献:

- (1) J.P. Chen, et al., *LC GC*, in press.
- (2) M. Gu, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 764–770 (2006).
- (3) Y. Wang, Methods for operating mass spectrometry (MS) instrument systems, US Patent 6,983,213, Filed October 20, 2003.
- (4) T. Kind, *BMC Bioinformatics* 2006, 7,234 ([www.biomedcentral.com/1471-2105/7/234](http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/234)).
- (5) K.R. Blom, *Anal. Chem.* **73**, 715 (2001).
- (6) D. Kuehl, *Am. Lab Online Edition*, January 2008, Page 18,  
<http://americanlaboratory.texterity.com/al-online/200801ol/?pg=18>