

## AccuTOF DART 系统的峰形校正和分子式测定

结合创新的大气压离子化技术和高分辨飞行时间 (TOF) 质谱的AccuTOF DART系统<sup>[1]</sup>, 是未知化合物识别的有利工具。尽管系统具有相对较高的质量准确度, 但仅仅依靠质量准确度用于分子式筛选, 很难得到唯一的分子式。MassWorks sCLIPS的峰形校正能大大提高仪器唯一识别未知物的能力, 而且在存在干扰的情况下不需要额外校正也能很好识别。

### 引言

运行在 5000 或更高分辨率的飞行时间质谱 (TOF), 通过细致实验, 及将一个或更多内标与分析物选择性或同时引入质谱系统的锁定质量喷雾<sup>[2]</sup>或双喷雾<sup>[3]</sup>, 能够获得 5 ppm 甚至更高的质量精度。DART 离子化技术的发明, 大大简化了这些内标的引入, 由于可以适用不同类型的样品, 它可以很少或不需要样品制备过程, 实时或现场进行精确质量测定<sup>[4]</sup>。

虽然 5 ppm 的高质量精度对于元素组成检测是必要的, 但这对于未知物分子式识别并不充分, 即使是高于 ppm 级的质量精度, 也有一些化学上可能的分子式待选, 特别是当  $m/z$  高于 400 Da<sup>[5-6]</sup>。

幸运的是, 有其它重要信息能用于分子式测定。优于单同位素峰的单点精确质量测定, 对于一个给定离子, 整个同位素轮廓, 无论是完全分开与否, 包含潜在同位素分布的精细结构信息, 而这同元素组成密切相关。简单测定同位素峰 ( $M$ 、 $M+1$ 、...) 的相对强度, 对于减少可能分子式列表是非常有用的附加工具, 特别是化合物含有  $Br^-$ 、 $Cl^-$  或  $S^-$  有显著同位素特征元素时<sup>[5]</sup>。其它方式包括简单的计算机建模, 以及精心构建高斯或其它峰形函数<sup>[7-9]</sup>, 但是, 这些方式仅仅试图大致接近真正的同位素轮廓图, 因为实际测量得到的峰形是未知或不能使用, 导致产生百分之几的建模误差, 这个级别的误差大于分子式谱图之间的细微差别, 大大限制了同位素轮廓信息的使用。TOF MS 系统的离子到达时间分布 (峰形) 具有特征的较大拖尾, 建立足够准确的峰形函数用于分子式区分变得更为困难 (如果可能)。

这篇应用文章通过来自AccuTOF DART系统的一个实例, 显示了TOF MS峰形校正对于分子式识别的重要性, 说明不使用内标或外标, 利用MassWorks sCLIPS (自校正线形质谱图同位素轮廓搜索) 对于分子式检测的可行性。

### 实验

名义质量数  $m/z$  为 319 Da 的未知化合物及作为内标的 PEG 离子, 在 AccuTOF DART 系统测量, 然后将平均化的质谱输出为 JCAMP 数据格式输入到 MassWorks 软件 (Version 2.0, 2008 年 4 月 22 日发布, Cerno Bioscience, Danbury, CT, USA) 处理并进行分子式测定, 离子计数阈值设置为零, 以便确保采集得到真正的原始轮廓模式 MS 数据。

### 结果

图 1 (顶图) 显示了输入到 MassWorks 后的完全质谱图, 图 1 (底图) 显示名义质量为 319 Da 的感兴趣未知离子部分。虽然有 PEG 离子能用作校正标准, 但为了证明 MassWorks 2.0 新自校正特点 (sCLIPS) 的有用性, 在这个应用中决定忽略这个校正离子。

图 2 显示了 MassWorks sCLIPS 的通常数据处理流程。对比低分辨系统如单级四极杆的 CLIPS, sCLIPS 的关键区别是使用未知离子本身的单同位素峰进行峰形校正, 而不校正  $m/z$  质量轴, 这种方式的基本原理基于以下三点:

1. 未知离子的单同位素 (校正) 峰, 在  $m/z$  上尽可能地靠近其余的同位素峰

---

#### 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

- 未知离子的单同位素（校正）峰，在测量时间上尽可能靠近其余的同位素峰
- sCLIPS使用的场合，如较高分辨的MS系统，其单同位素峰与其它同位素如M+1等实现了很好的分离， $m/z$ 通常是相当准确的，不需要额外的 $m/z$ 校正。

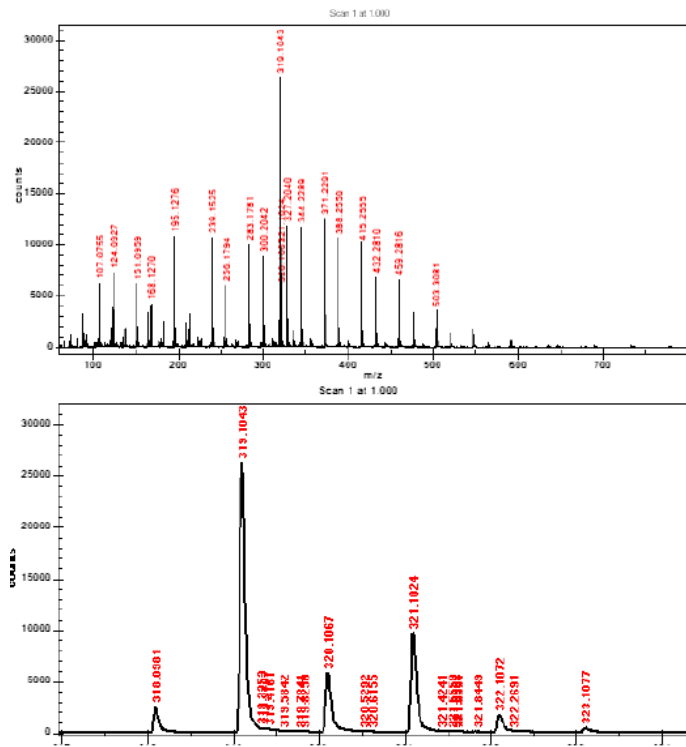


图 1. 一个平均的 AccuTOF DART MS 谱图（顶图 -- 完全的 MS 谱图；底图 -- 319 Da 未知离子的谱图部分）

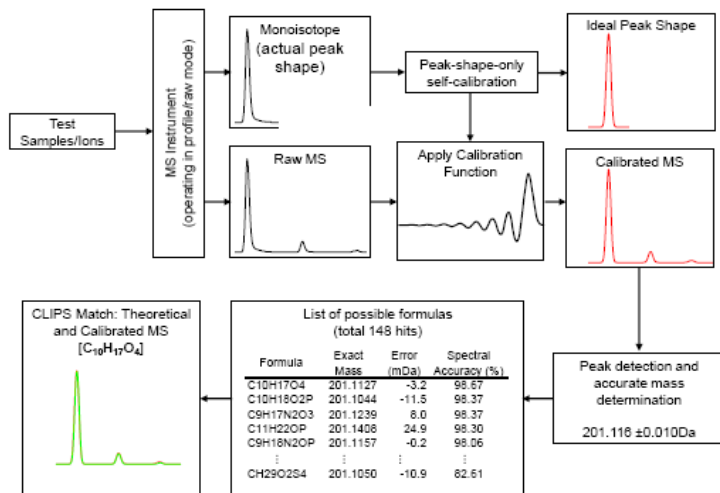


图 2. 高分辨 MS 系统用于分子式测定的 MassWorks sCLIPS 通常数据处理流程

一旦得到仅包含峰形的校正函数——有效地将实际峰形函数转换为理想（已知的、对称的和可用数学表达的）峰形函数，这个校正函数然后被用于到整个同位素轮廓图，包括其余的同位素峰，得到一个校正的同位素轮廓图。虽受随机噪音和其它测量条件（如检测器饱和）或数学误差影响，但这个校正后的同位素轮廓图本质上应该与正确分子式的理论计算谱图是一样的，换句话说，作为下面定义的谱图准确度应该接近 100.00%。

$$SA = \left( 1 - \frac{\|e\|_2}{\|r\|_2} \right) \times 100$$

这里， $e$  是符合残余向量， $r$  是校正的同位素轮廓向量， $\|\cdot\|_2$  代表向量的函数（或者平方和的方根）。谱图准确度指标用于评价在一定质量误差范围内，测定的实际单同位素峰精确质量与实际单同位素峰质量相近的所有可能分子式的元素组成与给定化学式的符合程度。具有最高谱图准确度的分子式是感兴趣未知离子的最可能正确分子式。

图 3 显示了仅仅单同位素峰（顶图）和全部同位素轮廓（底图）经过 sCLIPS 校正前后的峰形对比，校正后的理想峰形明显地补偿了 TOF 的峰形拖尾，而没有任何明显的分辨率损失。应该注意的是，在 318 Da 存在一个可能来自 M-H 离子的质谱干扰，当 sCLIPS 分子式测定时也应该考虑。

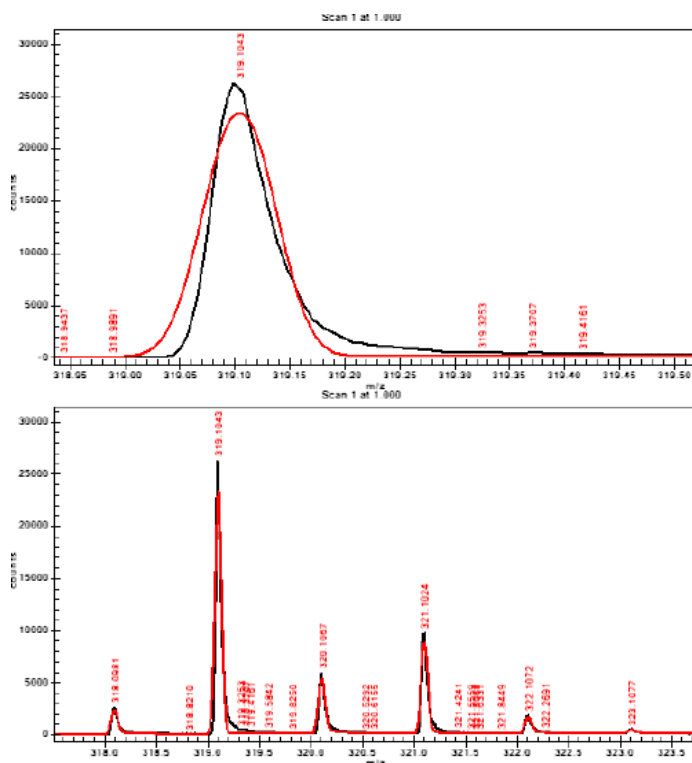


图 3. 感兴趣离子的原始（黑色）和峰形校正后（红色）质谱图（顶图 -- 单同位素峰；底图 -- 包含可能 M-H 离子的完全同位素轮廓）

表 1 显示了 sCLIPS 分子式测定参数和结果，需要注意的是，可能存在的 M-H 构形用于混合搜索，MassWorks 2.0 的一个新特点能处理三个相关的干扰离子，相应地，谱图准确度工具现在能够计算相对于 319.1043 Da 测定精确质量，从 -1.5 Da 到 4.5 Da 的质量范围，因此覆盖了可能干扰离子的全部同位素轮廓。总共 70 种不同分子式满足  $\pm 10$  mDa 的质量偏差（见表 1），正确的分子式  $C_{17}H_{20}N_2SCI$ ，显示了 97.27% 的最高谱图准确度。

作为 MassWorks 2.0 的新增特点，用户可以点击列表中的每个分子式，将分子式计算得到的理论质谱图与校正后的谱图进行叠加，观察匹配程度。图 4 显示了校正后质谱图与排名靠前（正确）的理论分子式  $C_{17}H_{20}N_2SCI$  的谱图叠加，说明包含来自 M-H 离子贡献的全部同位素轮廓的很好谱图匹配。事实上，软件额外说明了 M 和 M-H 的相对浓度为 91% 和 9%。对比图 3 中显示的原始

谱图与校正谱图的不同，峰形校正清楚地表明了在高谱图准确度上起到了关键的作用，这有助于实现唯一的分子式测定，更有意义的是这是不需要内标或外标校正的前提下实现的。

表1. sCLIPS分子式检测参数和结果（仅显示了70个待选分子式的前16个）

Accurate Mass	319.1043				
Charge	1				
Mass Tolerance (mDa)	10				
Electron State	Even				
DBE (Min)	-1				
DBE (Max)	50				
Profile Mass Start (Da)	-1.5				
Profile Mass End (Da)	4.5				
Element	Minimum	Maximum			
C	0	50			
H	0	100			
N	0	10			
O	0	10			
S	0	5			
Cl	0	2			
Mixture Search	-H				

Rank	Formula	Mono Iso- tope	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)	Spectral Accuracy
1	C17H20N2SCI	319.1036	-0.7279	-2.2812	97.2665
2	C15H24O3SCI	319.1135	9.168	28.7305	96.5226
3	C18H20O3CI	319.1101	5.7972	18.1672	96.1848
4	C20H16N2CI	319.1002	-4.0988	-12.8446	95.666
5	C15H16N4O2CI	319.0962	-8.1215	-25.451	95.3132
6	C12H20N4O2SCI	319.0995	-4.7507	-14.8876	95.3055
7	C11H20N6OSCI	319.1108	6.4827	20.3153	94.9893
8	C14H16N6OCI	319.1074	3.1119	9.7519	94.9518
9	C14H24N2S2CI	319.1069	2.6429	8.2822	94.5673
10	C15H24OS2CI	319.0957	-8.5905	-26.9207	94.4946
11	C14H20O6CI	319.0948	-9.4589	-29.6421	94.4085
12	C13H20N2O5CI	319.1061	1.7745	5.5608	94.0019
13	C11H24O6SCI	319.0982	-6.0881	-19.0787	93.5715
14	C8H16N10SCI	319.0969	-7.436	-23.3028	93.4716
15	C10H24N2O5SCI	319.1094	5.1453	16.1242	93.2443
16	C9H24N4O2S2CI	319.1029	-1.3799	-4.3242	92.4923

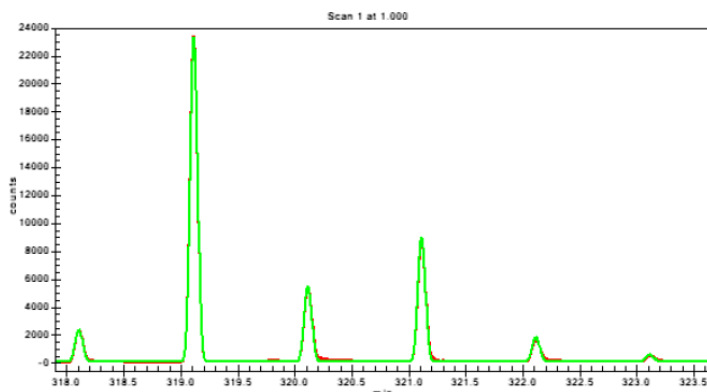


图4. 谱图准确度为97.27%排在第一位的分子式 (C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>SCI) 的理论质谱图 (绿色) 与校正谱图 (红色) 的叠加

图 5 显示了校正后谱图与排名第二分子式 (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>SCI) 的谱图匹配，该分子式仅有 15 个碳，谱图准确度为 96.52%，显示在 320 Da 峰上的轻微不同，再一次表说明了用已知峰形函数对真正同位素轮廓建模的重要性。有趣的是，在表 1 的可能分子式列表中，排在顶部的待选分子式具有氮元素，说明这种叠加质谱图能作为分子式可能元素检测的有效工具用。

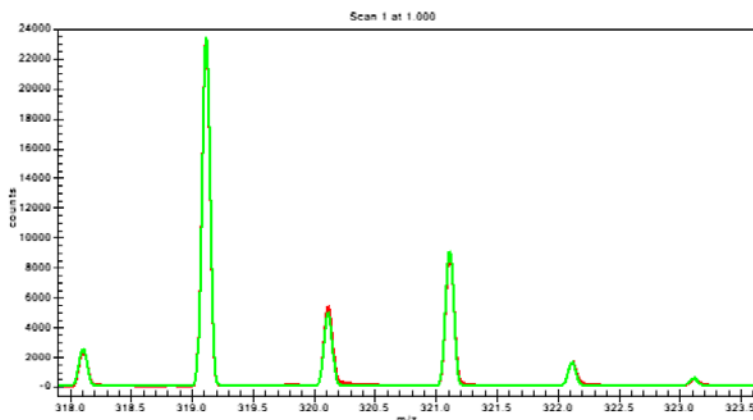


图 5. 谱图准确度为 96.52%排名第二的分子式 (C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>SCI, 无氮元素) 的理论谱图 (绿色) 与校正谱图 (红色) 叠加图

## 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

相似地，图 6 显示了没有考虑 M-H 离子干扰时地谱图叠加，质谱窗口为更小的-0.5- 4.5 Da，可以观察到明显的谱图准确度降低（96.36%，相对于表 1 或图 4 中包含 M-H 时的 97.27%），这个谱图匹配的降低也能在 320 Da 离子匹配图中清楚地看到。

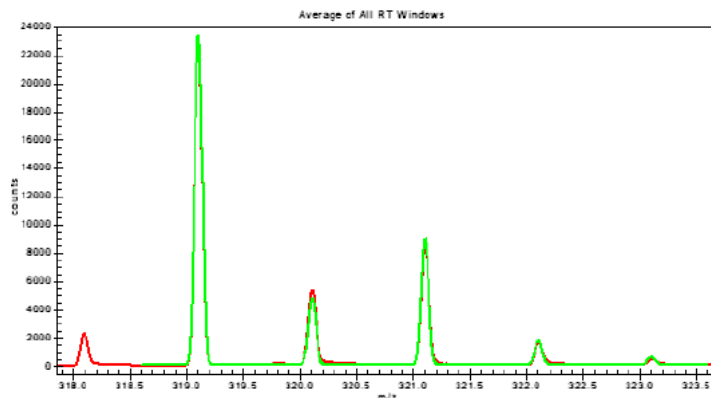


图 6. 没有考虑 M-H 离子的谱图准确度为 96.36%排名第一的分子式 ( $C_{17}H_{20}N_2SCl$ ) 的理论谱图 (绿色) 与校正后谱图 (红色) 的叠加

## 结论

MassWorks sCLIPS 不需要内标或外标校正标样，通过利用未知物本身的同位素离子进行关键的峰形校正。峰形校正结合在 AccuTOF DART 系统上已经得到的高质量准确度，实现了分子式的唯一识别，大大增加了仪器使用的方便性。增加的混合物搜索和交互式谱图叠加功能，允许用户查看校正和理论计算谱图的匹配程度，对于任何存在的质谱干扰提供有价值的信息，也可以在分子式测定过程中包含和排出某些元素。

## 致谢

感谢 JEOL USA, Inc 的 Robert B. Cody 博士为本文提供的数据及其热情讨论。

## 参考文献

- [1] Jeol Ltd. Tokyo, Japan
- [2] [http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en\\_US&cid=1000396](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=1000396)
- [3] Edgar Naegele, Pharma Asia, April 25, 2008, <http://www.pharmaasia.com/article-5582-statisticevaluationofmassaccuracymeasurementsbyesitofwithasampleofdegradationproductsfromtheantibiot-Asia.html>.
- [4] Robert B. Cody et al, Anal. Chem. 2005, 77, 2297-2302.
- [5] Kind, T. BMC Bioinformatics 2006, 7, 234.
- [6] Don Kuehl, Am. Lab. Online, January 2008, <http://americanlaboratory.texterity.com/al-online/200801ol/?pg=18>
- [7] Evans, J. E.; Jurinski, N. B. Anal. Chem. 1975, 47, 961-963b
- [8] Tenhosaari, A. Org. Mass Spectrom. 1988, 23, 236-239.
- [9] Do Lago, C. L.; Kascheres, C. Comput. Chem. 1991, 15, 149-155.
- [10] Yongdong Wang, US Patent 6,983,213, filed October 20, 2003.
- [11] Yongdong Wang, Cerno Application Note Number 103, December 2006, [http://www.cernobioscience.com/resources/ApplicationNotes/Agilent\\_LC-MS\\_Single\\_Quad\\_Infusion.pdf](http://www.cernobioscience.com/resources/ApplicationNotes/Agilent_LC-MS_Single_Quad_Infusion.pdf)

## 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