

前 言

近年来，质谱技术日新月异，每年质谱厂家纷纷推出各种质谱创新技术，以满足不同领域的需求，主要集中在几个方面：更高灵敏度，更高分辨能力，更快分析速度，更高质量精度，对复杂基质有更好的分析能力和耐受力等。

质谱技术的出现，主要是为了对化合物分子量的测定，结构解析推测，以达到化合物定性的目的，随着法规和行业的要求，对一些低含量的，复杂基质的化合物定量分析，质谱技术已成为首选工具，如三重四极杆串联质谱，是目前食品安全，药物代谢等领域必备的分析仪器。

质谱的种类分为：低分辨和高分辨。低分辨质谱，如大家熟知的单级四极杆质谱，三重四极杆串联质谱，被各个行业广泛使用，由于仪器本身只是单位质量分辨，不能得到化合物的精确质量数，对未知物的定性分析，只能依靠谱库或标样来确定，定性功能受到限制，对于进一步的定性分析需求，则寄希望于高分辨质谱，如飞行时间质谱，甚至傅立叶回旋共振质谱。其特点是可以得到精确质量数，精度可达到几个PPM，乃至1个PPM以内，目的就是要得到更为精确的质量数，以期候选的化合物尽可能的少，但仅仅依赖精确质量数，而不进行同位素峰形校正，并不能给出唯一的候选化合物分子式，与目标化合物的质量数偏差最小的，并不一定是目标化合物。

美国CERNO BIOSCIENCES公司推出的2006年美国匹兹堡科学仪器博览会获奖产品—MASSWORKS在低分辨质谱和高分辨质谱两者之间架起了桥梁，利用其精确质量数测定和同位素峰形校正专利技术，让低分辨的质谱真正实现高分辨的功能，在低分辨的质谱上进行精确质量数测定，并且对候选化合物进行同位素峰形校正检索，确定最为可能的唯一化合物分子式，极大地拓展了低分辨质谱的功能；同时针对高分辨质谱，应用其同位素峰形自我校正专利技术，有助于确定化合物唯一分子式。

本应用文集收录了七篇MASSWORKS应用文章，希望能给广大质谱工作者提供一些有用的信息，更多资料可以从分析测试百科网上下载：www.antpedia.com。不足之处，请大家多提意见。

北京绿绵科技有限公司市场部

二零零九年十月

目 录

LTQ/Orbitrap分子离子谱图精度测定并确定元素组成	3
MassWorks结合单位分辨质谱识别喹诺酮类药物分子式	10
农药残留分析中准确定性新技术——MassWorks	13
通过精确质量确定元素组成：从四极杆到傅立叶变换离子回旋共振质谱仪	16
超越质量精度——质谱仪器上被忽视了的谱图准确度	20
危机环境和本土安全事件中利用快速响应GC/MS流动实验室提高未知物识别的确认能力...	23
药物中杂质鉴定新技术——MassWorks	28

LTQ/Orbitrap分子离子谱图精度测定并确定元素组成

——发表于American Society for Mass Spectrometry 2058-2069 2009

John C. L. Erve,^a Ming Gu,^b Yongdong Wang,^b William DeMaio,^a and Rasmy E. Talaat^a

^a Drug Safety and Metabolism, Wyeth Research, Collegeville, Pennsylvania, USA

^b Cerno Bioscience, Danbury, Connecticut, USA

摘要：除了质量精度，能够准确反映离子同位素分布信息的谱图精度是质谱仪可以获得的又一重要信息。本文用LTQ/Orbitrap在以分辨率分别为7.5、15、30、60和100 K时，对分子量分布范围从639-1663 Da的10种天然产物（莫昔克丁 Moxidectin、红霉素 Erythromycin、地高辛 Digoxin、利福平 Rifampicin、两性霉素 B Amphotericin B、雷帕霉素 Rapamycin、短杆菌肽 S Gramicidin S、环孢霉素 A Cyclosporin A、万古霉素 Vancomycin、硫链丝菌素 Thiostrepton）进行了测定。用Massworks对原始质谱图进行校正，并用Massworks软件的sCLIPS功能比较校正后的质谱图和可能分子式的理论质谱图获得谱图精度。在允许质量误差2 ppm范围内，可能包含的元素条件（ $C_{0-100}H_{0-200}N_{0-50}O_{0-50}Cl_{0-5}S_{0-5}$ ）识别目标物的分子式，比较分别以质量误差和谱图误差排序的结果，谱图误差能够显著提高目标物分子式在待选分子式中的排名，当分子量大于900 Da时，谱图精度可以用来排除99%以上的假阳性分子式。

尽管质谱硬件技术和软件技术不断的向前发展，用质谱定性和解析彻底未知化合物仍然充满着挑战。高的质量准确度和质量精度对我们识别小分子化合物具有非常大的帮助，但对分子量大于600 Da，且元素组成复杂的化合物，即使质量误差小于1ppm,仍将有许多的待选分子式我们无法排除。高分辨质谱中包含的强同位素丰度信息，可以帮助我们排除那些尽管质量误差已经非常小，但同位素信息匹配较差的分子式。由于Br、Cl和S含有显著的同位素分布，很容易被识别而得到广泛的应用；而像C、H、O和N由于其同位素分布不显著，那就需要我们借助特殊的数学方法去识别他们的同位素信息。

目前，主要有3种已公开发表的常用方法，他们可以用来识别目标物中的同位素分布信息，并用以识别目标物的分子式。下面就这三种方法进行简单的说明：

1. Waters公司高分辨质谱软件MassLynx中的iFIT功能。它的过程为，先将质谱采集的轮廓图转换成质心图，然后借助质心图的同位素信息识别分子式，未对质谱图进行校正。

2. 布鲁克 Daltonics 软件中的SigmaFit功能，它直接利用仪器获得的轮廓图与理论质谱图比较，来识别分子式，未对质谱图进行校正。

3. MassWorks（美国Cerno科技公司）软件的sCLIPS功能，检索之前，先对质谱峰形进行校正，然后比较校正后质谱图与理论质谱图，获得谱图精度后，识别目标物的分子式。

本文以分子量分布范围从639-1663 Da的10种天然产物（图1和表1）为例，评价了不同分辨率下，LTQ/Orbitrap的谱图精度及其对分子式识别的影响，并比较了分别以质量精度和谱图精度识别目标物分子式的能力。

材料和方法

分别以2.3 mM, 1.1 mM, 1.4 mM, 3.3 mM的乙醇溶液保存利福平、环孢菌素A、莫昔克丁和雷帕霉素；1.0 mM, 0.27mM, 1.4 mM的水溶液保存万古霉素、两性霉素B和红霉素；1.5 mM, 20mM, 0.88 mM的二甲亚砷溶液保存硫链丝菌素、地高辛和短杆菌素S。使用前用50%的甲醇水溶液稀释至2-10uM，正离子模式加0.1%的甲酸，负离子含0.1%的乙酸胺。LTQ/Orbitrap配置基于TriVersa NanoMate芯片的电喷雾离子化系统。正离子模式喷雾电压1.4-1.7 kV, 负离子模式喷雾电压1.65-1.85 kV, 无需鞘气和辅助气，传感器温度125℃。以50-150 nL/min流速，40-50 psi柱头压蠕动泵进样5-8 uL, 喷雾针直径5 um。

用标准溶液至少每两个月对LTQ/Orbitrap进行一次校正。通过自动增益控制调节注入时间（50至350 ms）保持质谱内的目标离子数量为100,000。为了获得最佳的质量精度，正离子用异搏定（ m/z 455.29043），负离子用SDS（ m/z 265.147903）进行时校正。用Xcalibur软件采集和处理质谱数据。

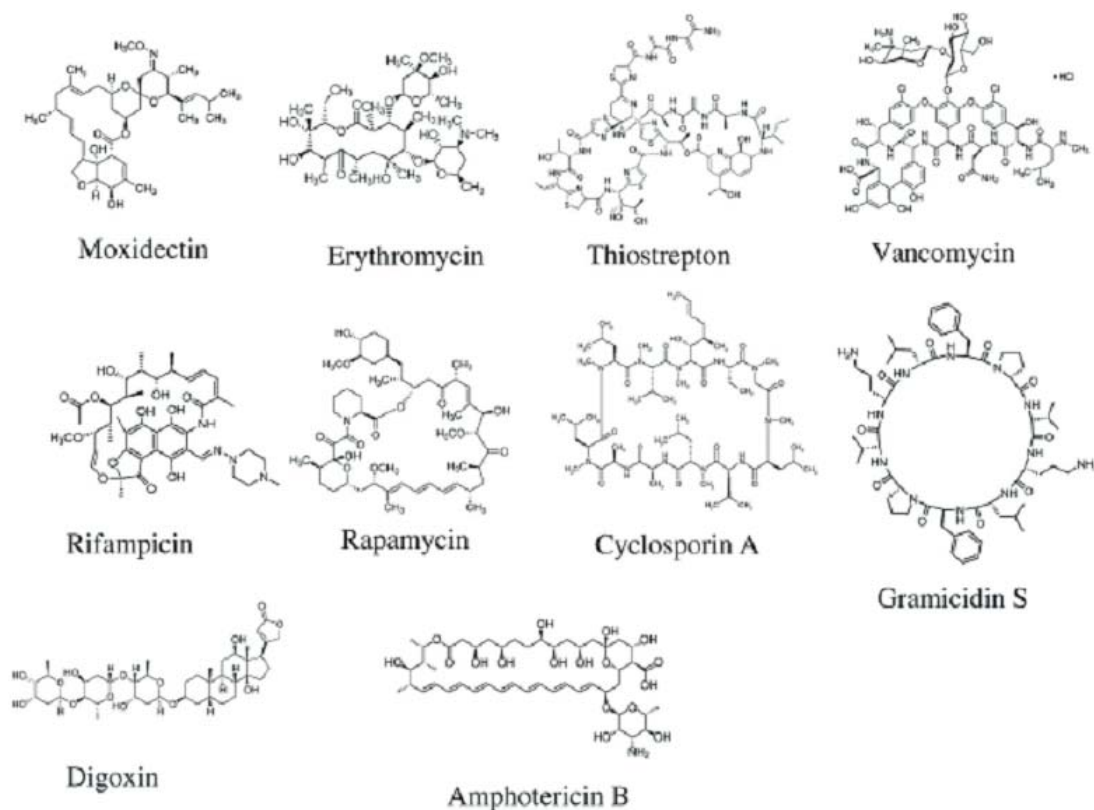


Figure 1. Structures of the compounds used in the study.

Table 1. Molecular formulas and exact masses of the protonated or deprotonated molecules investigated in the study

Compound	Molecular formula	Polarity	Monoisotopic m/z
Moxidectin	C ₃₇ H ₅₃ N ₀ O ₈	(-)	638.3698
Erythromycin	C ₃₇ H ₆₇ N ₀ O ₁₃	(-)	732.4539
Digoxin	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄	(-)	779.4223
Rifampicin	C ₄₃ H ₅₈ N ₄ O ₁₂	(+)	823.4124
Amphotericin B	C ₄₇ H ₇₃ N ₀ O ₁₇	(+)	924.4951
Rapamycin	C ₅₁ H ₇₉ N ₀ O ₁₃	(+)	936.5444*
Gramicidin S	C ₆₀ H ₉₂ N ₁₂ O ₁₀	(+)	1141.7132
Cyclosporin A	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	(+)	1202.8486
Vancomycin	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	(+)	1448.4375
Thiostrepton	C ₇₂ H ₈₅ N ₁₉ O ₁₈ S ₅	(+)	1664.4996
Agilent Ion	C ₃₀ H ₁₉ N ₃ O ₆ P ₃ F ₄ 8	(+)	1521.9715

*As sodium adduct.

用MassWorks（美国Cerno科技公司）软件的sCLIPS功能校正质谱图并获得谱图精度数据。质谱采集的原始质谱图经校正后，比较校正后的质谱图和待选分子式的理论质谱图获得谱图精度，是准确识别目标物分子式的重要工具。以目标物的单同位素峰为基准，校正其整个质谱图（包含全部的同位素信息）。图2是用Massworks 识别目标物分子式条件设置参数。校正范围（calibration range）的设置参考单同位素的半峰宽，分辨率分别为7.5、15、30、60和100 K时，对单电荷离子分别设置为 0.5、0.25、0.1、0.075、和0.05

Da, 双电荷离子分别设置为0.25, 0.13, 0.05, 0.038和0.025 Da, sCLIPS检索设置的允许质量为 2 ppm, 谱图误差由100%减去谱图谱精度得到。

The screenshot displays the sCLIPS software interface. At the top, the 'Accurate mass to search' is set to 1664.5008, with a charge of 1. Below this, there are options for 'Show All Results' and 'Show Top 20 Results'. The 'Formula Generation by Mass' section includes 'Mass Tolerance' (set to 2.00 ppm), 'Electron State' (set to Even), and 'Double Bond Equivalent Range' (Min: -1.00, Max: 50.00). A table lists elements and their ranges: C (0-100), H (0-200), N (0-50), O (0-50), Cl (0-5), S (0-5), and Na (0-0). The 'Formula Determination by Spectral Accuracy' section shows 'Profile Mass Range (Da)' from -0.50 to 7.50, 'Interference Rejection' at 0, and 'Calibration Range (Da from Mono)' from -0.50 to 0.50. There are also fields for 'Mixture Search' (Formula 2 and Formula 3) and a 'Calibration Parameters' button.

Figure 2. Screen shot of sCLIPS interface.

结果与分析

表2 是LTQ/Orbitrap在不同分辨率下测得目标物的光谱精度和质量误差。除少数例外情况, 谱图精度随分辨率的提高而降低。按质量误差 ≤ 0.5 , ≤ 1.0 , ≤ 1.5 , ≤ 2 ppm, 将质量误差分为四个等级, 当分辨率由7.5提高到100k, 质量误差没有得到显著的提高。

Table 2. Mass and spectral errors for measurements made at 7.5, 15, 30, 60, and 100 K resolving power on the Orbitrap

Name	Error	Orbitrap resolving power setting (K)				
		7.5	15	30	60	100
Moxidectin	Mass (ppm)	<2	<1	<0.5	<0.5	<0.5
	Spectral (%)	1.95 ± 0.04	1.58 ± 0.02	2.11 ± 0.02	2.94 ± 0.02	4.95 ± 0.02
Erythromycin	Mass (ppm)	<2	<2	<2	<2	<2
	Spectral (%)	1.60 ± 0.03	1.69 ± 0.07	2.15 ± 0.02	2.33 ± 0.03	2.60 ± 0.01
Digoxin	Mass (ppm)	<2	<1.5	<1.5	<1.5	<1.5
	Spectral (%)	1.65 ± 0.18	3.09 ± 0.26	2.78 ± 0.09	3.32 ± 0.05	3.86 ± 0.18
Rifampicin	Mass (ppm)	<1	<0.5	<0.5	<1	<1
	Spectral (%)	1.36 ± 0.15	1.33 ± 0.03	1.68 ± 0.23	2.55 ± 0.20	2.64 ± 0.70
Amphotericin B	Mass (ppm)	<0.5	<1.5	<1.5	<1	<1.5
	Spectral (%)	1.58 ± 0.14	1.73 ± 0.03	2.15 ± 0.10	2.67 ± 0.24	3.15 ± 0.40
Rapamycin	Mass (ppm)	<0.5	<2	<1	<1	<1
	Spectral (%)	1.11 ± 0.06	1.72 ± 0.02	1.89 ± 0.06	1.95 ± 0.02	2.20 ± 0.04
Gramicidin S	Mass (ppm)	<1	<2	<1	<1.5	<1.5
	Spectral (%)	0.94 ± 0.12	1.06 ± 0.06	1.62 ± 0.03	1.97 ± 0.07	3.04 ± 0.20
Gramicidin S*	Mass (ppm)	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	Spectral (%)	1.62 ± 0.01	1.84 ± 0.03	2.57 ± 0.02	3.71 ± 0.01	6.48 ± 0.04
Cyclosporin A	Mass (ppm)	<1	<1	<1.5	<1.5	<1.5
	Spectral (%)	0.63 ± 0.17	1.67 ± 0.16	1.74 ± 0.27	2.13 ± 0.20	3.37 ± 0.10
Vancomycin	Mass (ppm)	<1	<1.5	<1	<1	<1
	Spectral (%)	2.23 ± 0.14	2.75 ± 0.22	3.80 ± 0.17	8.83 ± 0.13	12.81 ± 0.34
Vancomycin (fragment)	Mass (ppm)	<1	<1.5	<1	<1	<1
	Spectral (%)	1.46 ± 0.04	1.52 ± 0.06	2.13 ± 0.03	3.49 ± 0.02	5.99 ± 0.08
Vancomycin*	Mass (ppm)	<1.5	<1	<1	<1	<1
	Spectral (%)	3.00 ± 0.01	3.03 ± 0.03	3.27 ± 0.03	4.54 ± 0.04	4.51 ± 0.04
Thiostrepton	Mass (ppm)	<2	<1	<1.5	<1.5	<1.5
	Spectral (%)	2.38 ± 0.17	1.41 ± 0.13	3.18 ± 0.10	3.59 ± 0.13	5.64 ± 0.39
Thiostrepton*	Mass (ppm)	<1	<1	<0.5	<1	<1
	Spectral (%)	1.25 ± 0.29	1.71 ± 0.27	2.64 ± 0.17	4.05 ± 0.23	6.48 ± 0.33
Agilent 1521	Mass (ppm)	<1	<0.5	<0.5	<0.5	<1
	Spectral (%)	1.39 ± 0.16	1.85 ± 0.04	1.91 ± 0.08	2.14 ± 0.06	2.65 ± 0.11

表3是分别以质量误差和谱图精度为依据，目标物分子式的排序结果。下文就各目标物分别进行讨论。

Table 3. Ranking of elemental formulas based on spectral error or mass error[†]

Compound	Rank	Orbitrap resolving power (K)				
		7.5	15	30	60	100
Moxidectin	Spectral error	2	2	2	2	2
	Mass error	4 (42)	8 (34)	8 (33)	7 (31)	4 (32)
Erythromycin	Spectral error	1	1	1	1	1
	Mass error	23 (48)	16 (45)	16 (45)	16 (45)	16 (46)
Digoxin	Spectral error	1	3	3	3	4
	Mass error	10 (97)	16 (99)	22 (96)	37 (99)	22 (99)
Rifampicin	Spectral error	3/2	3/2	3/1	3/3	1/1
	Mass error	60 (147)	13 (147)	46 (144)	34 (151)	24 (148)
Amphotericin B	Spectral error	1 [†]	1	1	1	2
	Mass error	30 (186)	45 (188)	40 (187)	26 (191)	28 (189)
Rapamycin	Spectral error	1	2	1	2	1
	Mass error	67 (281)	30 (275)	12 (278)	12 (278)	21 (278)
Gramicidin S	Spectral error	1	1	1	3	4
	Mass error	31 (570)	194 (577)	79 (584)	108 (577)	80 (584)
Gramicidin S*	Spectral error	1	1	1	3	3
	Mass error	183 (369)	76 (303)	97 (297)	97 (297)	54 (302)
Cyclosporin A	Spectral error	1	2	2	3	1
	Mass Error	134 (1,089)	200 (1,089)	245 (1,089)	222 (1,089)	270 (1,080)
Vancomycin	Spectral error	6	6	7	8	31
	Mass error	400 (1,523)	86 (1,515)	81 (1,529)	392 (1,529)	391 (1,529)
Vancomycin*	Spectral error	6	5	6	7	7
	Mass error	314 (769)	315 (769)	314 (769)	234 (774)	234 (774)
Thiostrepton	Spectral error	5	2	3	6	7
	Mass error	193 (1,908)	529 (1,919)	218 (1,908)	448 (1,912)	356 (1,912)
Thiostrepton*	Spectral Error	1	2	4	4	3
	Mass error	309 (971)	309 (971)	71 (978)	135 (973)	135 (973)

莫昔克丁 *Moxidectin*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由1.95%升到4.95%。允许质量误差小于0.5 ppm，如以质量误差进行排序，不同分辨率下，莫昔克丁在48个待选分子式中的排序介于4至8位之间；如以谱图精度进行排序，莫昔克丁均位于待选分子式的前2位。

红霉素 *Erythromycin*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，谱图误差由1.60%逐渐升到2.60%。不同分辨率下，以光谱误差排序，红霉素均位于48个待选分子式的第1位；如以质量误差进行排序，不同分辨率下，红霉素位于待选分子式的16至23位之间。

地高辛 *Digoxin*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，谱图误差由1.65%逐渐升到3.86%。以谱图误差排序，分辨率为7.5 K时，地高辛均位于99个待选分子式的第1位，分辨率为100 K时，地高辛均位于待选分子式的第4位；如以质量误差进行排序，不同分辨率下，地高辛位于待选分子式的10至37位之间。

利福平 *Rifampicin*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，谱图误差由1.36%逐渐升到2.64%。以谱图误差排序，分辨率为7.5 K至60 K时，利福平均位于150个待选分子式的前3位，分辨率为100 K时，利福平位于待选分子式的第1位。如以质量误差进行排序，不同分辨率下，目标物位于待选分子式的10至37位之间。由于利福平极易脱氢氧化成其醌类代谢物，因此在质谱图中利福平分子离子峰前看到其醌类代谢物的分子离子峰，醌类代谢物分子离子M+2、M+3和M+4同位素峰与利福平M、M+1和M+2重叠，从而增加了利福平的谱图误差。Massworks可以很好的处理目标物及其代谢物质谱叠加的现象，从而降低目标物谱图误差。经Massworks处理，利福平的谱图误差可以降低0.4%至1.1%。如以质量误差进行排序，不同分辨率下，利福平位于待选分子式的13至60位之间。

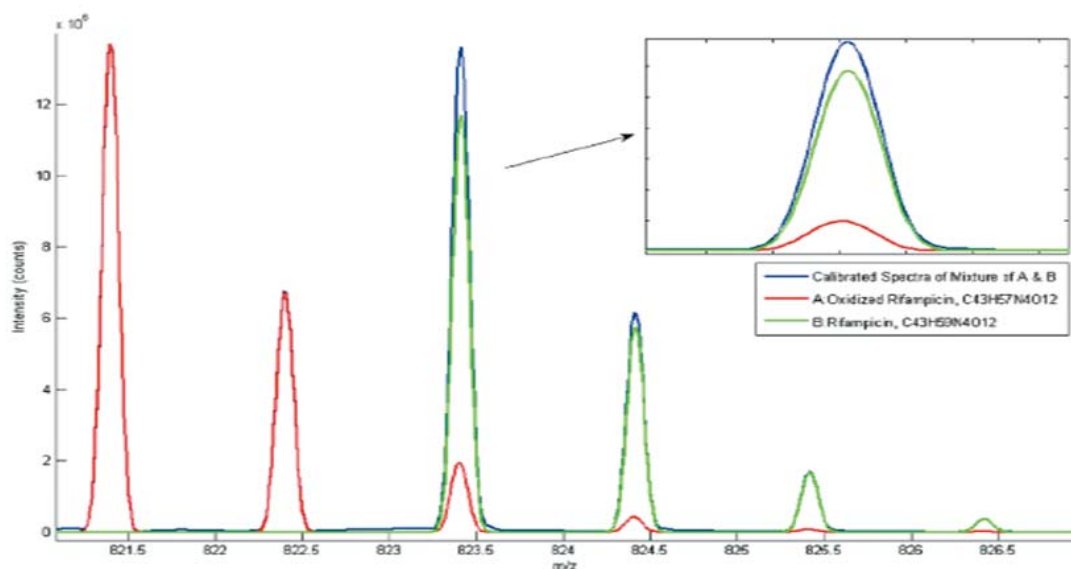


Figure 3. Spectrum of rifampicin at 15 K resolution. Rifampicin-quinone (oxidized rifampicin) is also present. When treating the spectrum as a mixture, spectral error is less than treating this as a pure compound.

两性毒素 B *Amphotericin B*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由1.58%逐渐升到3.15%。以光谱误差排序，除分辨率为100 K时，两性毒素 B位于190个待选分子式的第2位，其余分辨率均位于待选分子式的第1位；如以质量误差进行排序，不同分辨率下，两性毒素 B位于待选分子式的26至45位之间。

雷帕霉素 *Rapamycin*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由1.11%逐渐升到2.20%。不同分辨率下，以光谱误差排序，雷帕霉素位于280个待选分子式的第1位或第2位；如以质量误差进行排序，不同分辨率下，雷帕霉素位于待选分子式的12至67位之间。

短杆菌肽 S *Gramicidin S*

质谱图上我们可以观察到短杆菌肽 S的单电荷分子离子和双电荷分子离子。单电荷离子时，当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由0.94%逐渐升到3.04%；双电荷离子时，当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由1.62%逐渐升到6.48%。即使光谱精度较大，以光谱误差排序，由双电荷离子获得的短杆菌肽 S分子式仍处于369个待选分子式的前3位，结果几乎与由单电荷离子获得的结果一致。如以质量误差进行排序，不同分辨率和电荷条件下，短杆菌肽 S位于待选分子式的31至183位之间。

环孢霉素 A *Cyclosporin A*

当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由0.63%逐渐升到3.37%。不同分辨率下，以光谱误差排序，环孢霉素 A位于约1100个待选分子式的前3位；如以质量误差进行排序，不同分辨率下，环孢霉素位于待选分子式的134至270位之间。

万古霉素 *Vancomycin*

质谱图上我们可以观察到万古霉素的单电荷分子离子和双电荷分子离子。单电荷离子时，当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由2.23%逐渐升到12.81%；双电荷离子时，当分辨率由7.5 K提升到100 K，光谱误差由3.0%逐渐升到4.51%。以光谱误差排序，单电荷分子离子，除分辨率100 K时万古霉素位于31位，其余全位于约1500个待选分子式的前8位；如以质量误差进行排序，不同分辨率下，万古霉素位于待选分子式的81至400位之间。由于较低的质量误差，双电荷分子离子不同分辨率下，万古霉素均位于约774个待选分子式的前7位。如以质量误差进行排序，不同分辨率下，万古霉素位于待选分子式的234至314位之间，结果与单电荷离子相似。在万古霉素的质谱图中，除了其分子离子峰1448，我们可以观察到其脱去-C₇H₁₄NO₃基团的碎片离子1305，而且碎片离子（图4中d-f）受到的背景干扰要远小于母离子（图4中a-c）。有文献报道，万古霉素及其糖肽抗生素容易产生二聚体，二聚体离子是万古霉素的单电荷分子离子产

生质谱干扰的原因。由于万古霉素碎片离子不容易受到二聚体的干扰，因此当分辨率由7.5 K提升到100 K，谱图误差由1.46%逐渐升到5.59%，远低于母离子的单电荷离子。

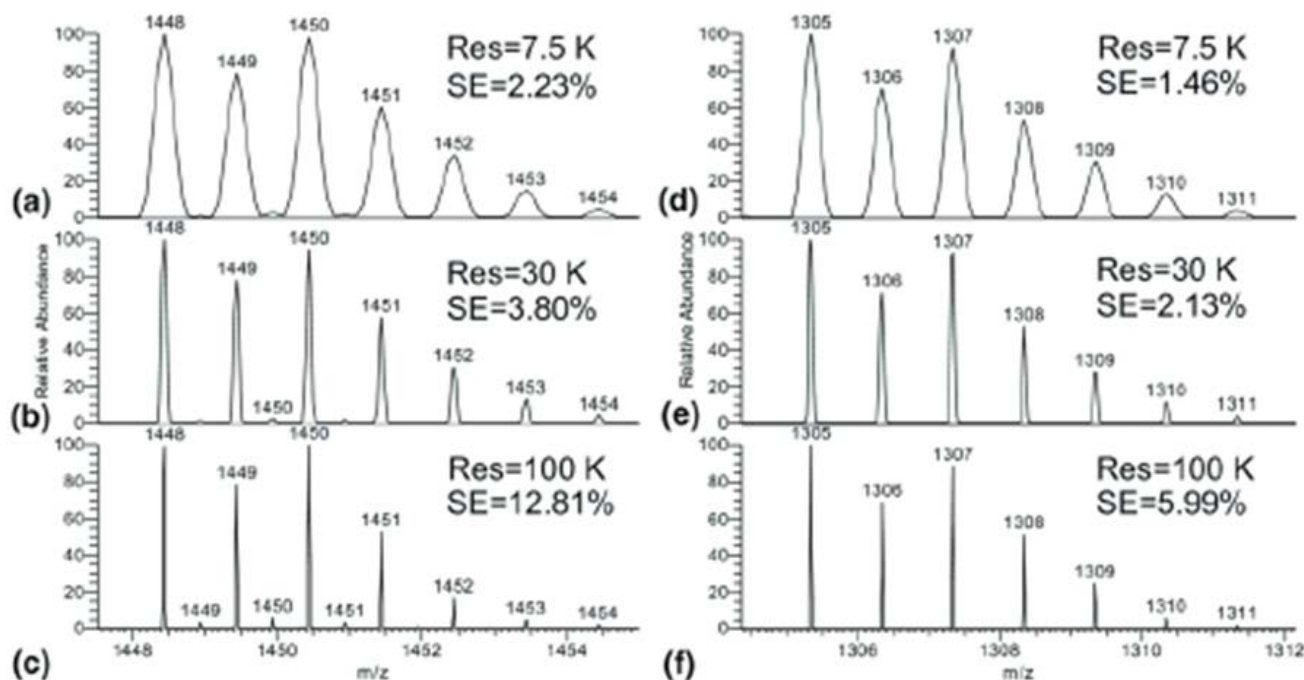


Figure 4. Spectra of singly charged vancomycin taken at 7.5 K (a), 30 K (b), and 100 K (c) resolution illustrating increasingly poorer spectral accuracy with increasing resolution. In contrast, spectra of a fragment of vancomycin taken at 7.5 K (d), 30 K (e), and 100 K (f) resolution have spectral errors less than 6%.

硫链丝菌素 *Thiostrepton*

质谱图上我们可以观察到硫链丝菌素的单电荷分子离子和双电荷分子离子。单电荷离子时，当分辨率由7.5 K提升到100 K，谱图误差由2.38%逐渐升到5.64%；双电荷离子时，当分辨率由7.5 K提升到100 K，谱图误差由1.25%逐渐升到6.48%。与短杆菌肽 S不同的是，以双电荷离子识别分子式的效果要好于单电荷离子，单电荷离子获得的硫链丝菌素分子式处于约1900个待选分子式的前7位，而双电荷离子获得的硫链丝菌素分子式处于约975个待选分子式的前4位。如以质量误差进行排序，不同分辨率下，硫链丝菌素位于待选分子式的71至448位之间。

结论

本研究的的目的之一是评价5种分辨率下，LTQ/Orbitrap 测定10种目标物（分子量大于600 Da）分子离子的谱图误差分布情况。除了少数特例外，谱图误差随分辨率的提高而增大。图6是不同分辨率下，谱图误差与质量数的分布关系图。结果表明，谱图误差与质量数之间不存在显著的相关性，谱图误差更多的依赖于目标物本身的同位素组成和仪器设定的分辨率。

本研究的另一个目的是评价分别以谱图误差和质量误差识别目标分子式的能力。Kind和Fiehn的研究表明，同位素丰度信息可以用来排除95%以上的假阳性待选分子式。本研究表明，即使在质量误差小于2 ppm情况下，谱图精度仍能提供我们强有力的工具，用以排除假阳性的待选分子式。对高分子化合物，如分子量1202 Da的环孢霉素 A和分子量1664 Da的硫链丝菌素，以谱图精度排序，目标物均位于占全部待选分子式个数最靠前的0.5%范围内，因此，可以排除99%以上的假阳性分子式。谱图精度除了可以帮助我们排除假阳性的分子式外，还有助于我们对目标物分子式的确证，这是因为，即使是用高分辨率质谱测定精确质量数，目标物的分子式往往不一定是质量误差最小的分子式，但目标物的分子式一定是谱图误差较小的分子

式。此外，谱图精度可以给我们提供干扰离子的信息，诸如母离子分子的二聚体离子、脱氢氧化物离子，这些信息将有助于我们进一步的鉴定目标物分子式。

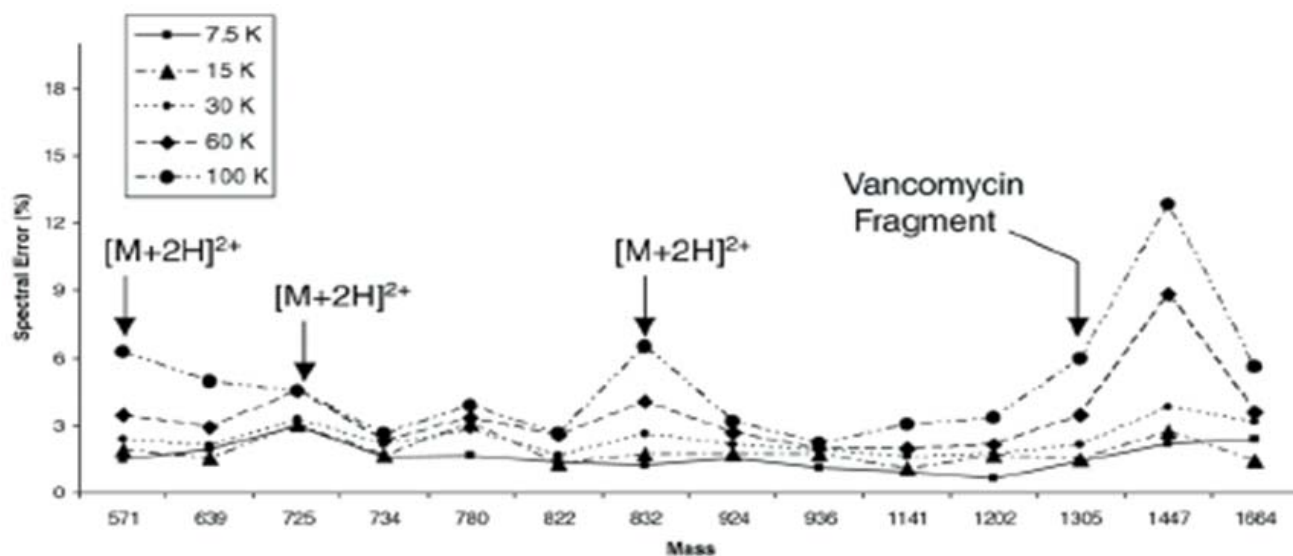


Figure 6. Plot of spectral error versus mass for each of the five different resolution settings.

致谢

作者感谢Wyeth同事Steven Unger博士和Chris Petucci博士在论文修改过程中的帮助；感谢LTQ/Orbitrap的发明者Alexander Makarov 博士在实验方面的指导和帮助。最后，感谢Alan Rockwood 博士在审稿时提出的审稿意见。

因本文篇幅较长在翻译时只做了简单翻译，具体参见原文

参考文献

略

来自用户的声音

"The accurate mass profile extract ion chromatogram (AMPXIC) obtained through accurate mass measurement and isotope profile - mode filtering [performed with MassWorks] eliminated the false positive peaks observed using conventional XIC in the metabolite profile."

比起通常离子提取图，准确质量轮廓离子提取图去除了许多在代谢产物分析中的假阳性峰

Wyeth Research Poster from ASMS 2008 美国惠氏公司2008年ASMS

MassWorks结合单位分辨质谱识别喹诺酮类药物分子式

周围¹, 李卫建²

(1.甘肃出入境检验检疫局技术中心, 兰州, 730020; 2.北京绿绵科技有限公司, 北京 100080)

——《质谱学报》2009年 第30卷

摘要: 利用Massworks软件对LC/MS采集的目标物质谱图经过适当的校正后, 实现了在单位分辨率质谱(LC/MS)上测定3种药物分子的精确质量数, 质量误差小于10mDa; 在精确质量数基础上, Massworks进一步利用其独特的同位素峰形校正检索技术(CLIPs), 实现了对目标药物分子式的准确识别, 从而建立了一项在单位分辨率质谱(LC/MS)上准确测定药物或天然产物分子式的新方法, 提升了单位分辨液质联用仪的定性能力。

关键词: Massworks 药物分析; 精确质量测定; 分子式识别;

对于表征药物及天然产物而言, 第一步和最重要的步骤就是确定分子质量(Mw), 以推测目标物的分子式。单位分辨质谱适合已知化合物的分子式识别, 而对于新的未知物, 则需要借助高分辨质谱测定精确质量数, 然后推测其分子式。但高分辨质谱仪价格昂贵, 操作复杂, 使精确质量数的测量和应用受到限制。美国Cemo Bioscience公司利用同位素规律开发出一种软件(MassWorks), 该软件通过建立校正函数方程, 并将同位素效应、仪器噪音过滤、峰形补偿纳入函数方程中, 经过计算校正Profile模式质谱图, 可以在单位分辨质谱上测定精确质量数, 并利用其独有的同位素峰形校正检索技术(CLIPs), 准确识别药物或天然产物的分子式。本文以3种药物为例, 建立了一项在单位分辨率质谱(LC/MS)上测定精确质量数, 并准确识别目标药物分子式的新方法。

1 试验部分

1.1 主要仪器与试剂

Acquity UPLC-Quattro premier XETM质谱联用仪, 配有电喷雾离子源(ESI)及Masslynx 4. 1数据处理系统。美国Cemo Bioscience公司 MassworksTM质谱分析软件, Version: 2.0。氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星(纯度均大于99.0%); 中国药品生物制品检定所产品。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱为BEH C18柱(50mm×2.1mm×1.7μm); 流动相: A相为乙腈, B相为0.2%甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~6min, 10%A线性变化至90%A; 流速为0.3 mL·min⁻¹; 柱温为30℃; 进样量为10μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 毛细管电压3.5kV, 萃取电压3.0V, 预六极杆电压0.3V, 源温100℃, 脱溶剂温度200℃, 脱溶剂气速350 L·h⁻¹, 锥孔反吹气速50 L·h⁻¹。一级全扫描采集数据, 扫描模式profile mode, 扫描m/z范围设定为300至400。

1.3 数据处理

将环丙沙星(m/z 332)和沙拉沙星(m/z 386)作为校正标准, 用MassWorks对质量轴和质谱峰形进行校正, 获得校正函数; 利用MassWorks将校正函数运用到其他3种药物的一级全扫描Profile质谱图进行校正计算, 获得目标物的精确质量数, 再经过MassWorks同位素峰形校正检索技术(CLIPs)实现目标物分子式的准确识别。

2 结果与讨论

2.1 药物分子量的测定

用Masslynx 4. 1打开样品总离子流图, 氧氟沙星、诺氟沙星在总离子流图未能得到分离保留时间均为1.67 min, 恩诺沙星的保留时间为1.67 min。分别以3种药物的保留时间为中心, 选取0.05 min时间窗口, 显示

其质谱图,从图中我们可以发现,尽管氧氟沙星、诺氟沙星在总离子流图上未得到分离,但由于二者分子量相差较大,他们在质谱图上得到了很好的分离,Masslynx 4.1测定的诺氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星的精确质量数见表1,分别为320.2、360.1、362.1 Da。获得目标物的质量数后,仅仅是质谱定性的第一步,质谱定性的终结目标是获得目标物的分子式。我们以质量误差0.2Da, C、H、O、N、S、P、F、Cl、Br为可能含有的元素,其中限定最少含1个F,推测3种目标药物的分子式,其待选分子式个数分别为6038、8965、11133,这给我们准确识别目标物真正的分子式带来了困难。

表1 3种药物的分子量测定结果及对应的待选分子式

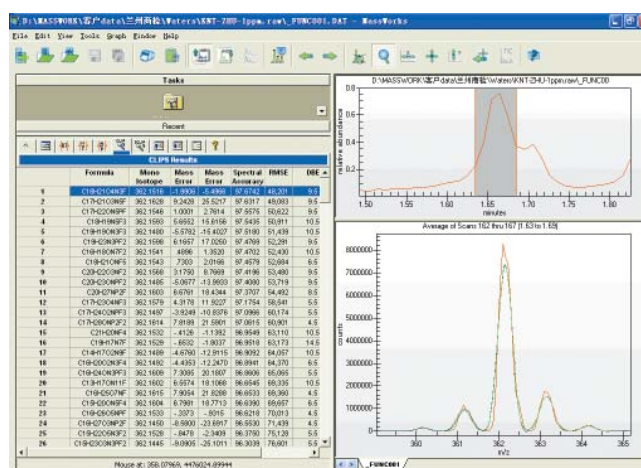
药物	化学式	准确 分子量	Masslynx 分子量	待选分子 式个数	Massworks 分子量	待选分子 式个数
诺氟沙星	C16H19FN3O3	320.1410	320.2	6038	320.1435	123
恩诺沙星	C19H23FN3O3	360.1723	360.1	8965	360.1813	155
氧氟沙星	C18H21FN3O4	362.1516	362.1	11133	362.1533	248

利用Massworks软件对Masslynx 4.1采集的一级全扫描质谱图进行校正计算,可以获得3种目标药物的准确相对分子质量分别为320.1435、360.1813、362.1533 Da,误差分别为2.5m、1.7m、7.7m Da、从而实现了在单位分辨质谱上测定目标物的精确质量。由于Massworks可以极大地提高单位分辨质谱的质量精度,质量误差低于10m Da。因此我们以质量误差10mDa,同样的元素组成条件,推测3种目标药物的分子式,可以显著的减少待选分子式的个数,分别为123、155、248,从而降低了我们准确识别分子式的难度,但即使要从123个分子式中准确识别目标物的分子式,仍然有着很大的难度。

2.1 药物分子式的准确识别

Massworks软件不仅可以帮助我们单位质量分辨质谱测定目标物的精确质量,而且可以进一步实现目标物分子式的准确识别。利用Massworks软件对Masslynx 4.1采集质谱图峰形进行校正,经过MassWorks同位素峰形校正检索技术(CLIPs),逐一比较待选分子式的理论质谱图与仪器测得的目标物的校正质谱图,从而实现目标物分子式的准确识别。图1是Massworks准确识别氧氟沙星分子式的结果,如以质量误差排序,氧氟沙星2.0 mDa的误差只能排在待选分子式的第54位,但由于氧氟沙星的同位素峰形与仪器获得目标物的校正同位素峰形具有最大相似度97.7%,排在全部248个待选分子式的第一位,从而实现了目标物分子式的准确识别。采用同样的处理,Massworks软件可以从123个待选分子式中准确识别诺氟沙星,从155个待选分子式中准确识别恩诺沙星。

图1 Massworks准确识别氧氟沙星分子式结果



3 小结

本文使用Massworks软件对单位分辨质谱采集的质谱图,进行质量轴和质谱峰形的校正,实现了准确分子量的测量,3种目标药物的测量结果误差小于10 mDa,从而极大提高了单位分辨质谱在药物中未知物

的定性能力。

早在上世纪60年代, Beynon就开始利用同位素峰高比推测化合物分子式组成, 近年来也有些软件在此方面的应用, 尤其是在高分辨质谱中得到应用。但所有这些方法都需要假定某种峰形函数方程(通常为高斯函数分布), 而仪器测得的质谱峰形往往得不到我们理想的高斯分布, 影响了同位素峰高比推测化合物分子式的能力。Massworks软件方法强调校正质量偏差的同时, 首次提出校正同位素峰形, 以数学表达化的同位素峰形推测化合物分子式的组成, 从而实现了目标物分子式真正的准确识别。难能可贵的是, Massworks软件将这种高分辨质谱中同位素信息运用到单位分辨质谱, 进一步提升了单位分辨质谱在药物中未知物的定性能力。本实验利用CLIPs技术, 实现了从几百种待选分子式中准确识别诺氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星。

参考文献:

- [1] Gu, Ming, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20: 764-770.
- [2] 刘可, 马彬, 王永东. 一种新软件方法用于单位分辨质谱仪上药物相对分子质量的准确测定. *药学学报.* 2007, 42(10): 1112-1114.

来自用户的声音

"Starting a little bit "speechless" from our side your Presentation helped really changing our mindset, from "unbelieving into "believer". After this Test with a sample taken from real life with real interferences my colleagues and I fully agree that MassWorks is indeed a powerful tool for advanced GC/MS analysis. We found that MassWorks is really a "must have" product for us..."

一开始, 我们被你们的结果惊讶得哑口无言。你们的讲座和演示真正地改变了我们的观念。真是千闻不如一见。在经过具有干扰的实际样品的盲样测试后, 我和我的同事都一致认为MassWorks确实是用于气质分析十分有效的工具。我发现MassWorks是我们是必不可少软件。

Researcher from Merck Germany
德国默克的研究人员

"The ability to provide the elemental identification of unknown compounds on a routine basis by any scientist is now within one's reach."

由于MassWorks的超越性能, 对任何从事质谱分析的人确定分子式已成为举手之劳。
Eli Lilly Poster from ASMS 2007 美国礼来制药公司

农药残留分析中准确性新技术 — MassWorks

王亚男¹, 汪聪慧¹, 李卫建²

(1.中国农业科学院农业与可持续发展研究所, 北京100081; 2.绿绵科技, 北京 100080)

——《中国农业科技导报》2009年

摘要: 利用Massworks软件对GC/MS采集的农药质谱图经过适当的校正后, 可以在低分辨率质谱(GC/MS)上测定目标物的精确质量数, 质量误差小于10 mDa; 在精确质量数基础上, Massworks进一步利用其独特的谱图准确度功能, 实现了对目标物及其碎片分子式的准确识别, 从而建立了一项在低分辨率质谱(GC/MS)上准确性农药残留的新方法。

关键词: 农药残留; 定性; 新技术; Massworks

GC/MS技术在农药残留检测中得到广泛应用, 该技术利用保留时间和GC/MS谱图检索对目标药物进行定性。然而, 当色谱分离效果不佳, 或目标物受到基质干扰等时, 往往会出现NIST库检索匹配率不高, 或几个待选物的匹配率相似等情况, 此时, 通过GC/MS谱库检索定性就会产生很大的不确定性。为准确性样品中的农药残留, 我们往往需要借助另外的手段, 如高分辨质谱测定目标的精确质量数, 并识别目标物的分子式, 以对这些目标物进行准确性。高分辨质谱(如飞行时间质谱TOF, Orbitrap质谱仪)高昂的采购成本及使用成本, 极大的限制了其在常规实验室的普遍使用。最近在质谱数据处理上的进步, 对于在单位分辨质谱上实现准确的分子式识别显示了巨大的潜力^[1]。该应用基于精确质量数和线形校正的新技术, 在单位分辨质谱上得到精确质量数和精确的同位素峰形匹配(谱图准确度)用于分子式识别, 得到的结果与高分辨测量仪器具有很好的可比性。本文以3种常见的除草剂为例, 通过GC/MS检测, Massworks校正后, 在低分辨率质谱测定目标物的精确质量数, 并对其分子式进行准确识别, 从而在GC/MS建立了一种定性新方法, 提高了农药残留检测过程中质谱定性的准确性^[2]。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

Agilent GC/MS 6890 / 5975联用仪。美国Cemo Bioscience公司 MassworksTM质谱分子式识别软件。标准物质购自Dr.Ehrenstorfer Co(德国), 纯度≥97%。目标分析物贮备液均用甲醇配制为1000 mg/kg, 于4℃冰箱中封存。

1.2 质谱条件

毛细管色谱柱: HP-5 MS (30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μm); 进样口温度: 260℃; 载气(氦气)流速: 1 mL/min; 程序升温: 初始温度40℃, 保持1 min, 以30℃/min升至130℃, 然后以5℃/min升至250℃, 再以10℃/min升至300℃, 保持5.00 min, 最后以50℃/min升至300℃, 保持5.00 min。离子源(EI)温度: 230℃; 分析器温度: 150℃; 传输区温度: 280℃; 采用原始扫描(RAW SCAN)进行检测, 质量范围150-300 Da。阈值: 0; 事件: 43 min打开电子阀采集全氟三丁胺; 45 min关闭。

1.3 数据处理

用MassWorks校正质量轴和质谱峰形, 是获得精确质量数的关键。通过校正, 可以将原始的质谱图转变为校正质谱图, 并确定目标物的精确质量数; 然后, 经过同位素峰形校正检索技术(CLIPs)是获得高的谱图精度和准确识别目标物分子式的关键。

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项基金

作者简介: 王亚男(1983-), 女, 研究实习员, 主要从事农业环境监测分析研究

2 结果与分析

为了在低分辨质谱上测定目标物的精确质量数，将PFTBA的碎片作为校正标准，对质量数和质谱峰形进行校正，以获得校正函数，如图1 是以C4F9⁺碎片进行校正的例子（校正后获得的精确质量数是218.9856Da, C4F9⁺的理论质量数是218.9856Da,质量误差0.04mDa；校正后获得的质谱图与理论质谱图的谱图准确度为99.5%）。然后，将校正函数应用到GC/MS采集的除草剂质谱数据中。

利用Massworks软件，用校正函数对3种除草剂的一级全扫描的质谱图进行校正后，我们就可以在低分辨率的气质联用仪上测定各除草剂的精确质量数，结果如下：甲氧丙净的精确质量数为255.1524 Da，质量误差-0.63 mDa；莠灭净的精确质量数为227.1192 Da，质量误差1.17 mDa；莠灭净的精确质量数为213.1063 Da，质量误差1.48 mDa。

无论是高分辨率质谱还是低分辨质谱，测定精确质量数的目的都是为了能够得到目标物的分子式，以达到对目标物的准确性。Massworks在得到代测物的精确质量数后，一方面可以与高分辨率质谱一样，给出目标物的可能待选分子式；另外，Massworks可以根据其独有的CLIPs功能，对待选分子式以谱图准确度进行排序，以实现目标物分子式的准确识别，从而达到对目标物的准确性。

图2是Massworks分子式识别的检索参数设置，设定允许的质量误差10 mDa；设定可能的元素种类，并最大限度的设定可能元素的最少和最多元素个数；由于气质的分子离子均为奇电子离子，因此设定离子状态为奇电子（odd）。

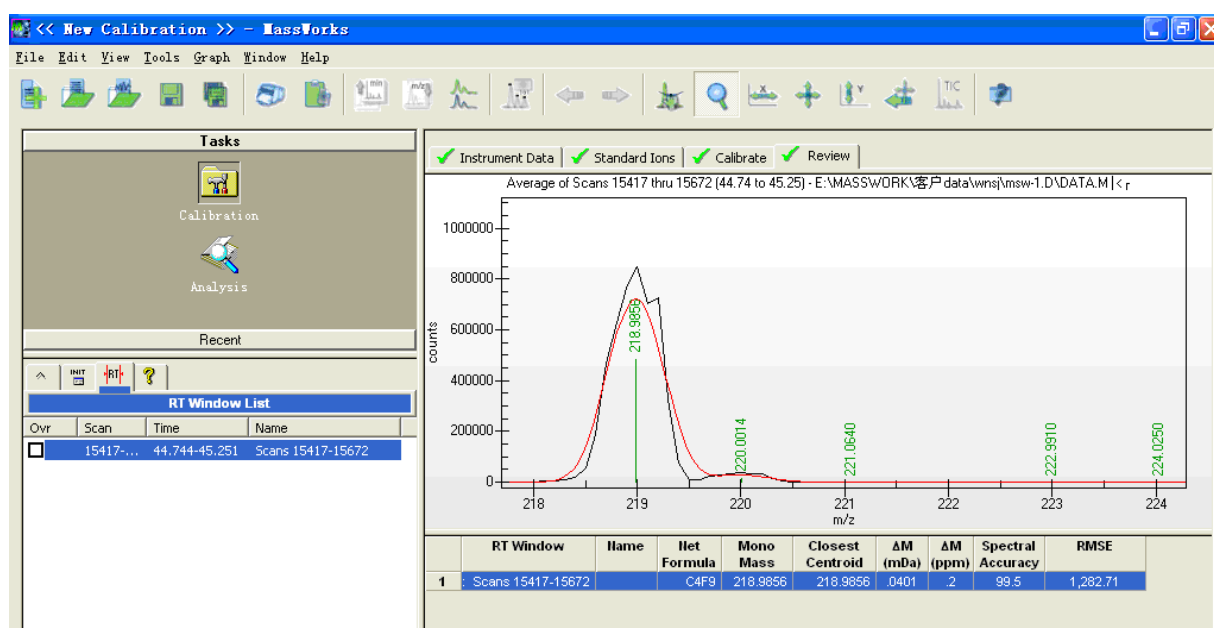


图3是Massworks识别除草剂甲氧丙净的结果，图3中上部的图是3种除草剂的总离子流图，其中莠灭净和西草净未能彻底分离，甲氧丙净达到基线分离。下图是选中总离子流甲氧丙净选定部分平均值谱图，图3中左边列表表示Massworks识别分子式结果列表，由于我们用GC/MS测定的目标物的质谱图，经Massworks校正后质谱图，与C11H21N5S（甲氧丙净）的理论质谱图具有最大的相似度，谱图准确度达99.18%，从而位于待分子式的第1位，实现了对甲氧丙净的准确性。

Massworks不仅可以识别经色谱分离目标物的分子式，而且对色谱共流出成分，只要能够经质谱分离，也可以实现对其分子式的准确识别，且可对其碎片的分子式进行准确分离。表1 是对莠灭净和西草净共流出物，以及甲氧丙净碎片分子式识别的结果。

图2 Massworks识别除草剂的检索参数设置

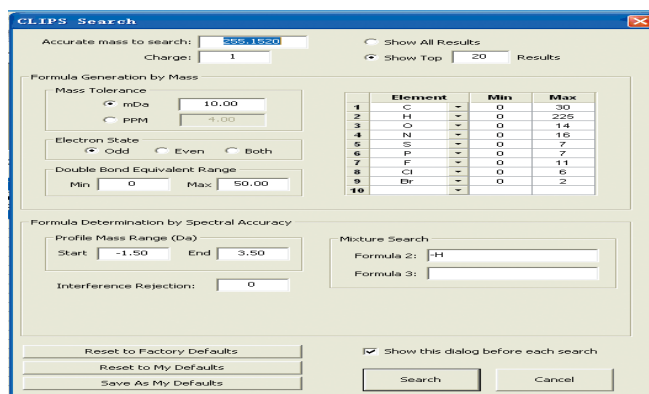


图3 Massworks测定甲氧丙净分子式结果

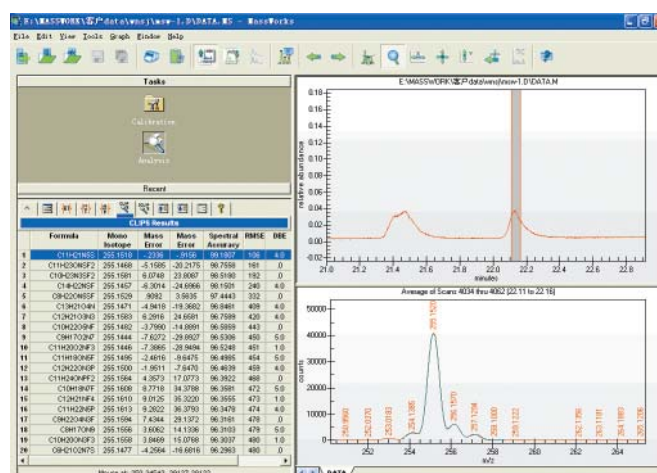


表1 莠灭净、西草净、甲氧丙净及其碎片Massworks检索结果

化学式	化学式	排序	精确质量	质量误差mDa	光谱精度
西草净	C8H15N5S	1	213.1063	-1.4838	99.0717
莠灭净	C9H17N5S	1	227.1192	1.1663	99.522
甲氧丙净	C11H21N5S	1	255.152	-0.2336	9.1807
碎片1	C10H18N5S	1	240.1246	3.6913	98.6514
碎片2	C9H17N5S	1	227.1062	14.3663	97.2738
碎片3	C11H20N5	1	222.1609	10.97	98.5125

3 结论

对GC/MS采集的质谱数据用PFTBA校正后,可以获得各除草剂及其碎片的精确质量数,质量误差小于10mDa,在低分辨质谱实现了测定目标物的精确质量数的功能,从而以扩展了实验室现有仪器的功能。在测定目标物精确质量数的基础上,Massworks应用其谱图准确度功能,实现了目标化合物分子式的准确识别。

参考文献:

- [1] Gu, Ming, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20: 764-770.
- [2] 刘可,马彬,王永东.一种新软件方法用于单位分辨质谱仪上药物相对分子质量的准确测定. *药学报.* 2007, 42(10): 1112-1114.

通过精确质量确定元素组成： 从四极杆到傅立叶变换离子回旋共振质谱仪

顾鸣，王永东

(Cerno Bioscience, 14 Commerce Drive, Danbury, CT 06810, USA)

——发表于分析测试学报, Vol.26 (2007)

利用质谱测定元素组成的方法已被广泛应用于各研究领域，如：药物研发、药物代谢、环境研究、法医、食品安全、香精香料、兴奋剂以及天然产物等。传统的观念认为，要测定元素组成，必须获得高质量精度；而高质量精度只能从高分辨率质谱获得，如：TOF, Orbitrap或者FT ICR MS。

最新的傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR MS)，其质量分辨率达到800,000:1，通过它可以得到<200ppb的质量精度。但即使在高的质量精度下，仍然会存在好几个候选的化学式，必须依靠其它手段去选择和推断。而在飞行时间质谱(TOF)上，典型的质量精度约为5ppm，通常候选的化学式有5~10个，加大了选择和推断的难度。不幸的是，在上述情况下，正确的结果往往不是质量误差最小的候选化学式。所以仅仅依靠精确质量一个条件，很难得到唯一可靠的化学式。但这些有着非常近似质量的候选者由于元素组成不同而产生了不同的同位素分布，这个特点可用于进一步区分它们。

过去，研究者通过调节峰的宽度，来模拟和假定一个同位素高斯分布，试图用这个高斯峰形来区分上述的差异。但由于候选者彼此间同位素分布的差异极小（通常只有几个百分点），所以过去的方法常常是失败的，除非化合物中存在特征元素如Cl或Br。

为了区分同位素分布之间的微小差异，发展了一种综合的、同时包括质荷比(m/z)校正和更为重要的峰形校正的方法，可以获取高精度的谱图，从而得到唯一的、正确的元素组成。而且，在低分辨的四极杆或者三重四极类型质谱仪上，也可用这种校正方法来获得唯一确定的化学式。

1.理论

在质谱中，质量精度符合方程式

$$\sigma \propto \frac{1}{R\sqrt{S}}$$

其中， σ 表示质量误差(ppm)；R表示质量分辨率，其定义为质量(m/z)除以半峰高处全峰宽(FWHM)；S表示离子信号强度，此时假定主要的噪音来源于离子计数噪音，因为硬件设计完好的质谱仪符合这种假定。这个方程，推动着新型质谱仪的发展，因为更高的分辨率与更好的质量精度成正比。

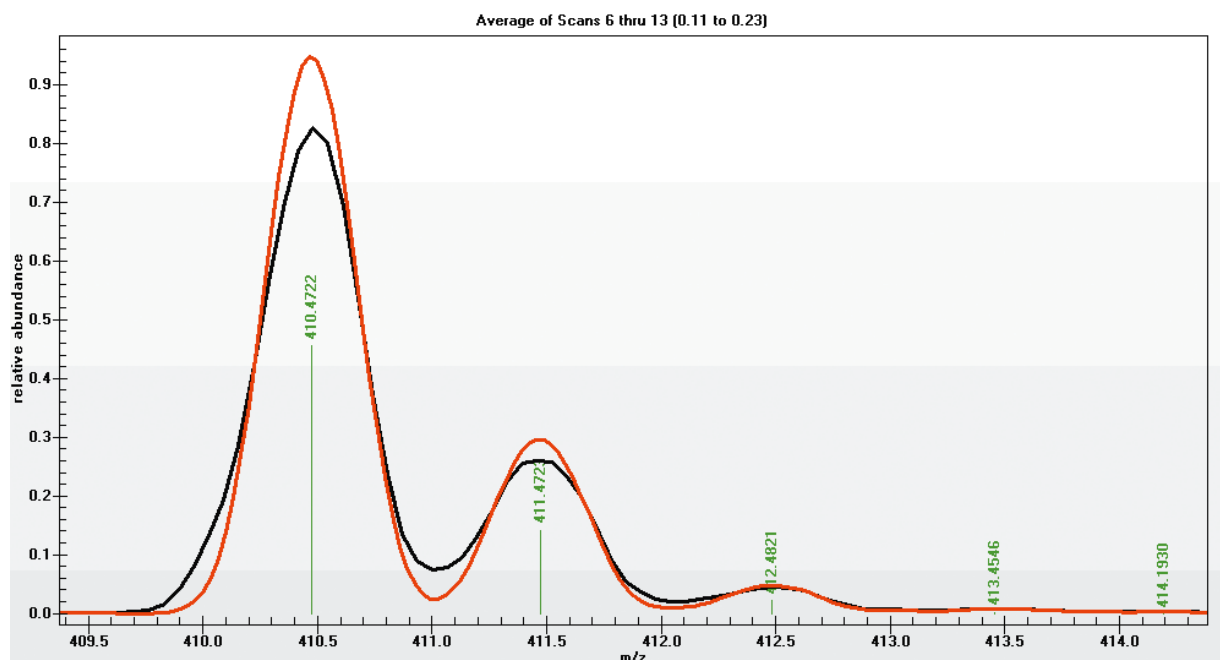
另外，常规的质谱校正仅仅是进行质量轴的校准，没有考虑质谱峰形的校正，而质谱峰形的校正对于可靠的质荷比测定以至于元素组成的确定也是至关重要的。下面我们将介绍的是一种新颖独特的方法，通过这种全新的质谱校正方法，不仅对质量轴进行了校正，而且把峰形函数校正为已知的数学峰形函数，这个峰形函数是可以根据已知标定离子的理论质量数和同位素分布推导出来。通过实际的谱图与理论的谱图在数学上的对比，任何质量漂移以及峰形失真都可以得到校正并归纳为一个校正函数。通过这个既有质量校正又有更为重要的峰形校正函数就可以获得甚至是低分辨下谱图的精确质量数。

2.实验

未知化合物(m/z=399 Da)同内标(m/z=410 Da, C₂₈H₆₀N⁺, 精确质量 410.4726 Da)混合，然后直接

进样进入Waters Quattro三重四级杆质谱。Profile（轮廓）采集模式，扫描范围50-550 Da，采集1分钟，共获得57个扫描，选择其中的8个扫描进行校正。使用内标 $C_{28}H_{60}N^+$ 的已知离子做校正离子，用MassWorks软件进行质量轴和峰形的校正。图1显示了校正前后的质谱轮廓图，可以非常准确地得到单同位素的质量数410.4722 Da，质量误差为-0.9 ppm。

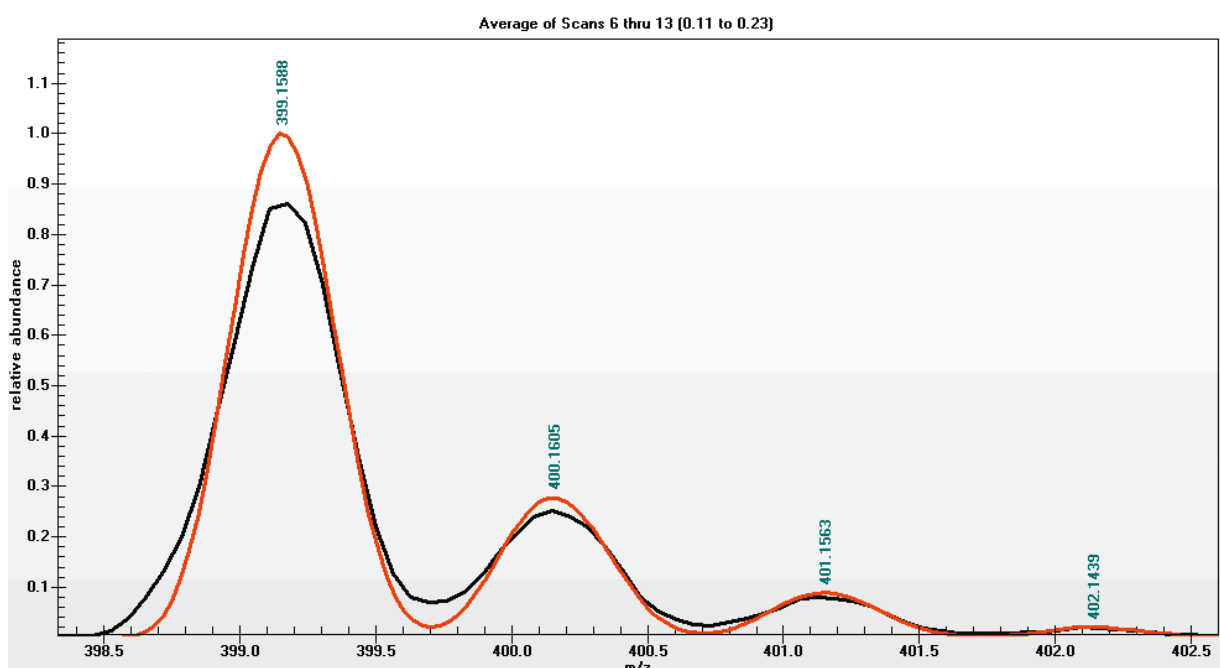
图1 标准离子的校正前质谱图（黑线）和校正后质谱图（红线）



3.结果和讨论

上面所述的0.9 ppm标定误差只是演示了：使用相同的离子（410 Da）校正后，内标离子和理论值的符合程度。下面我们来应用一个未知离子（399 Da的未知物离子），得到与图1类似形式的图2。

图2 未知离子的校正前质谱图（黑线）和校正后质谱图（红线）



使用MassWorks的CLIPS（校正的同位素轮廓谱线搜索）搜索元素组成，得到1,517种可能的化学式，表1列出了排序最前面的25种，排在第一位的 $C_{25}H_{23}N_2OS^+$ 质谱准确度为99.44%，表明测量的和理论的同位素轮廓的误差为0.56%。这个来自盲样分析样品的化学式在随后被合作者认为是正确的。

假定我们采用质量精度能够达到100ppb的傅立叶变换离子回旋共振质谱仪(FT-ICR MS)，仅仅以质量精度为条件搜索，会得到5个候选化学式。在排除掉一个不合理的化学式 $C_{13}H_{26}N_6O_2Na_3S^+$ 后，仍然有4个化学式落在100ppb的质量精度范围内（见表2）。注意其中三个错误的化学式在表1的前25位中并没有出现，这就表明：即使在单位质量分辨率的质谱中，也可以测定各个化合物的同位素分布差别；应用新型的质谱校正方法，在三重四级杆质谱上可以得到唯一确定的化学式。

表1 三重四级杆仪器通过MassWorks的CLIPS搜索得到的候选结果

Accurate Mass	399.1588					
Charge	1					
Mass Tolerance (mDa)	12					
Electron State	Even					
Double Bond Equivalent Minimum	-0.5					
Double Bond Equivalent Maximum	35					
Profile Mass Start (Da)	-1					
Profile Mass End (Da)	4.5					
Element	Minimum	Maximum				
C	0	33				
H	0	396				
N	0	28				
O	0	24				
F	0	21				
Na	0	17				
S	0	12				
P	0	12				
Rank	Formula	Mono Isotope	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)	Spectral Accuracy	DBE
1	C25H23N2OS	399.1531	5.7	14.3	99.441	15.5
2	C25H25FNaS	399.1559	2.9	7.3	99.438	12.5
3	C24H23N4S	399.1643	-5.5	-13.9	99.435	15.5
4	C24H25OF2S	399.1594	-0.6	-1.5	99.383	11.5
5	C23H24N2ONaS	399.1507	8.1	20.3	99.331	12.5
6	C23H25N2F2S	399.1707	-11.9	-29.7	99.295	11.5
7	C27H24FS	399.1583	0.5	1.3	99.288	15.5
8	C23H27O4S	399.1630	-4.2	-10.5	99.277	10.5
9	C22H24N4NaS	399.1619	-3.1	-7.9	99.269	12.5
10	C23H28O2SP	399.1548	4.0	10.1	99.254	10.5
11	C23H26FNa2S	399.1535	5.3	13.4	99.209	9.5
12	C22H24N2O2FS	399.1543	4.5	11.4	99.188	11.5
13	C22H28N2OSP	399.1660	-7.2	-18.0	99.171	10.5
14	C21H24N4OFS	399.1655	-6.7	-16.7	99.103	11.5
15	C22H26OF2NaS	399.1570	1.8	4.5	99.040	8.5
16	C24H28FS2	399.1616	-2.8	-7.1	99.023	10.5
17	C22H30FNaSP	399.1688	-10.0	-24.9	99.015	7.5
18	C21H25N2ONa2S	399.1483	10.5	26.3	98.960	9.5
19	C21H26N2F2NaS	399.1682	-9.4	-23.7	98.942	8.5
20	C22H27N2OS2	399.1565	2.3	5.8	98.931	10.5
21	C21H27N4S2	399.1677	-8.9	-22.3	98.929	10.5
22	C20H23N4O3S	399.1491	9.7	24.3	98.922	11.5
23	C22H29FNaS2	399.1592	-0.4	-1.1	98.896	7.5
24	C20H25N4Na2S	399.1595	-0.7	-1.8	98.883	9.5
25	C21H28O4NaS	399.1606	-1.8	-4.5	98.874	7.5

表2 采用100ppb质量精度的FT ICR 质谱得到的待选结果

Row	Formula	Mono Isotope	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPB)	DBE
1	C ₂₅ H ₂₃ N ₂ O ₂ S	399.15311	-0.0001	0	15.5
2	C ₄ H ₁₉ N ₁₆ O ₂ PNa	399.15311	-0.0029	-7	2.5
3	C ₂₀ H ₂₇ N ₂ FP ₂ Na	399.15312	-0.0108	-27	8.5
4	C ₁₀ H ₂₇ N ₁₀ O ₂ S ₃	399.15314	-0.0336	84	2.5

4. 结论

虽然质量精度在确定元素组成时非常重要，但即使使用高分辨率的FTMS质谱，如果仅仅应用质量精度一个条件，我们仍不能确定唯一的化学式。另一方面，对轮廓模式采集的质谱进行正确校正，以正确的同位素轮廓为基础，我们得到新的度量参数—谱图精度，它使我们即使使用单位分辨率的质谱，也可以获得唯一的、正确的化学式。

参考文献：

- [1] Blom, KR, Anal. Chem., 2001; 73: 715.
 [2] Gu, M., Wang, Y., Zhao, X., and Gu, Z., Rapid Commun. Mass Spectrum. 2006; 20: 1110.
 [3] Wang, Y., United States Patent, No. 6983213, granted January 3, 2006.

Elemental Composition Determination through Accurate Mass: From Quadrupole to FT ICR MS

Gu Ming, Wang Yong-dong
 (Cerno Bioscience, 14 Commerce Drive, Danbury, CT 06810, USA)

Abstract: A more comprehensive calibration involving m/z and peak shape has been developed to attain the high spectral accuracy necessary to achieve unique elemental composition determination. This approach can be applied for formula determination at much lower resolution such as single or triple quadrupole mass spectrometers.

Key words: Accurate mass; Elemental Composition Determination

Don Kueh, Wang Yong-dong

超越质量精度：质谱仪器上被忽视了的谱图准确度

(Cerno Bioscience, 14 Commerce Drive, Danbury, CT 06810, USA)

概览

- ▶ 仅仅依赖测量质量精度，即使达到1ppm，通常不能得到确定的元素组成结果 (ECD)
- ▶ 一个新颖的运算法则自校正质谱的线形峰型(谱图准确度)，提供了强大的ECD计量工具
- ▶ 谱图准确度通过同位素轮廓匹配，大大提高元素组成结果的准确识别能力，对于高分辨质谱，如TOF或Orbitrap，大大提升了其对分子式的明确识别能力

引言

即使是1ppm的质量精度，通常也不能得到明确的元素组成结果^[1]。很早以前就知道同位素轮廓图能够帮助未知离子的元素组成识别^[2]，但以前的方式仅限于包括峰比例或线形匹配的简单一级拟合^[3,4,5]。先前描述的一个新颖运算法则，不但校正了质量精度，同时也校正了线形谱图，大大提高了单位质量分辨质谱上的质量精度^[6]。这里开发了一个用于高分辨质谱的新方法，可以自校正其线形谱图，将谱图数据校正为可用数学表达的线形图型，产生具有高谱图精度的完美轮廓谱图，这个高精度的同位素轮廓匹配可以实现确定的元素组成。在这个工作中，利用不同类型的高分辨质谱，评价了用于元素组成结果的谱图准确度，说明了谱图准确度对于原则组成结果的重要优势。

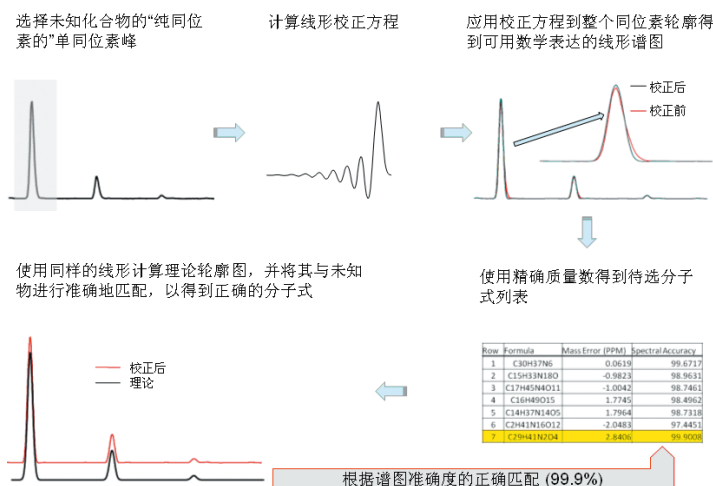
方法

谱图采集于三个不同类型的高分辨质谱，包括Finnigan Quantum Ultra (高分辨三重四极杆)、Bruker micrOTOF (TOF)和Finnigan Orbitrap。

质量范围从152到734 Da的不同小分子药物，通过LC/MS和直接注射方式运行在每个仪器上，全部数据在正离子化模式下采集以得到轮廓谱图。

分析采集得到的数据直接利用MassWorks软件读取、校正、后处理和分析。对于每个感兴趣的离子，应用下面描述的自校正和搜索程序。谱图准确度计算为 $(1-RMSE) * 100$ ，这里RMSE是校正和理论谱图的匹配误差。基于每个仪器的质量精度能力，预先定义一个质量精度窗口，进行元素组成搜索得到待选分子式列表，然后输入到同位素轮廓搜索。

用于谱图准确度的自校正



结果与讨论

Quantum Ultra (四极杆)的搜索结果

Run Type	Infusion				
Search window	30ppm				
Elements	C,H,N,O,Cl,S				
Nominal FWHM	0.15 Da				
Name	Exact Mass	Ion Formula	Number of Formulas	Spectral Accuracy	Rank
Acetaminphen	152.0712	C8H10NO2	11	99.3435	1
Promethazine	285.1425	C17H21N2S	97	99.5952	1
Buspirone	386.2556	C21H32N5O2	147	99.8259	1
Terfenadine	472.3216	C32H42NO2	246	99.8659	1
Loperamide	477.2309	C29H34N2O2Cl	531	99.7809	1
Tyr-Tyr-Tyr	508.2084	C27H30N3O7	694	99.3378	5
Reserpine	609.2812	C33H41N2O9	1123	99.8238	1

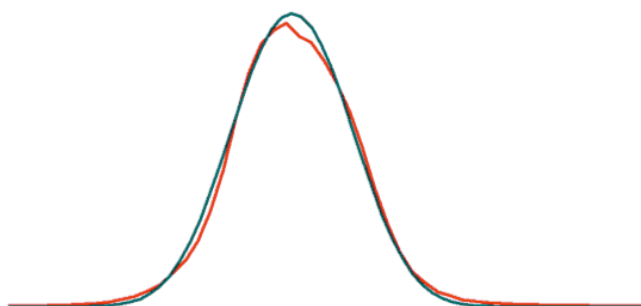
microTOF (TOF)的搜索结构

Run Type	Infusion				
Search window	5ppm				
Elements	C,H,N,O,Cl,S				
Nominal FWHM	.06 - .12 Da				
Name	Exact Mass	Ion Formula	Number of Formulas	Spectral Accuracy	Rank
caffeine	195.0876	C8H11N4O2	7	99.9086	1
emetine	481.3060	C29H41N2O4	54	99.9044	1
erythromycin ethyl succinate -water	844.5052	C43H74NO15	280	99.7798	1
erythromycin ethyl succinate	862.5158	C43H76NO16	295	99.8338	1

Orbitrap的搜索结果

Run Type	LC/MS				
Search window	3ppm				
Elements	C,H,N,O,Cl,S				
Nominal FWHM	0.03 Da				
Name	Exact Mass	Ion Formula	Number of Formulas	Spectral Accuracy	Rank
Quinidine	325.1916	C20H25N2O2	13	99.8352	1
Clozapine	327.1376	C18H20ClN4	19	99.7887	1
Ketoconazole	531.1565	C26H29Cl2N4O4	111	99.4985	1
Erythromycin	734.4690	C37H68NO13	100	99.9158	1

自校正前后的线形谱图纠正 (四极杆)



上面显示了三个不同仪器的自校正同位素轮廓搜索(s-CLIPS)结果, 说明对于提高质谱的化合物检测是一个强有力的工具。即使对于具有适中的质量精度, 如果单同位素峰完全分离, 可实现很好的分子式识别。

别。对于全部测量数据，根据谱图准确度15次测量中有14次正确的化合物排在第一位。例如：使用C、H、N、O、Cl和S进行酮康唑的元素组成搜索，如果要实现唯一识别，需要优于200 ppb的质量精度，即使对于1 ppm的质量精度，仍有超过40个待选分子式需要进一步进行评价。

另外，自校正方式不需要额外的仪器校正，也不需要额外的化学校正样，分析物离子本身就是校正物。更重要的是，这种校正方式接近完美，因为在质量轴位置和测量时间是尽最大可能的接近，这减小了仪器在时间和质量数漂移引起的误差。

结论

- 即使是质量精度高达1ppm，可能的待选分子式的数量也非常多
- MassWorks 谱图准确度作为一种全新的计量工具，能够实现待选分子式的准确排名，对于高分辨质谱，如TOF或Orbitrap，大大提升了其对分子式的明确识别能力
- MassWorks sCLIPS依靠新型自校正方式，不需要额外进行校正，对于每种分子式进行唯一确定，通过同位素轮廓检索不需要仔细校正仪器也能保证其最高的质量精度

参考文献

- [1] Kind, T. BMC Bioinformatics 2006, 7, 234.
- [2] S. M. Rock Anal. Chem.; 1951; 23(2); 261-268.
- [3] Roussis SG, Proulx R Anal. Chem., 75 (6), 1470 -1482, 2003.
- [4] Evans, J. E.; Jurinski, N. B. Anal. Chem. 1975, 47, 961-963.
- [5] Tenhosaari, A. Org. Mass Spectrom. 1988, 23, 236-239
- [6] Gu, M. et al RCMS, 2006, 20, 764
- [7] MassWorks software, Cerno Bioscience, Danbury, CT 06810

来自用户的声音

"With PFTBA calibration performed to each GC/MS run, mass accuracy better than 10mDa can be achieved and Spectral Accuracy of better than 99% can be achieved to help attain reliable formula determination. The mass calibration is stable after 11 days without significantly compromising formula determination. While mass calibration is more susceptible to time related variations, the Spectral Accuracy has been shown to be robust enough for formula determination after 19 days."

MassWorks 利用PFTBA标定气质数据，质量准确度与谱图准确度能分别达到小于10 毫道尔顿和99%，从而可以进行可靠的分子式鉴定。PFTBA标定相当稳定。同样的标定在11天内产生几乎相似的鉴定结果。质量准确度易于随时间漂移，但谱图准确度可保持长达19天几乎不变，从而更适用于分子式鉴定。

User at P & G Company 美国宝洁公司

"Determining the elemental composition of pure materials at modest resolution typical of quads has never been routinely practiced - CLIPS brings that task very close to practice for the general user. It is not too much of a stretch to suggest CLIPS will enhance the confidence of TOF-based assignments as well, which may even challenge slower FTMS-based determinations."

用低分辨率四极杆质谱仪可靠地确定纯化合物是史无前例的 - CLIPS给众多的四极杆质谱仪操作人员。可以并不夸张地说sCLIPS会帮助由时间飞行质谱仪或傅里叶变换质谱仪进一步准确地鉴定未知化合物。

User at P & G Company 美国宝洁公司

危机环境和本土安全事件中利用快速响应GC/MS流动实验室提高 未知物识别的确认能力

Jianping Chen¹、顾鸣²、王永东²、Don Kuehl²

(1 康涅狄格环境保护局, 康涅狄格州, 美国

2 Cerno Bioscience, 14 Commerce Drive, Danbury, CT 06810, USA)

——发表于LC/GC

摘要

本文描述一个新方法, 利用GC/MS分析挥发性有机物并大大提高其对“未知”化合物识别的准确度和可靠性。方法是基于先进的数据处理方法, 对GC/MS仪器获得的典型名义质量数据进行处理, 并结合GC/MS谱库大大提高了化合物识别的准确度。该方法基于建好的EPA方法用于分析挥发性有机物, 验证了总共90个环境相关化合物。

引言

康涅狄格环境保护局(CT DEP)位于康涅狄格州的Windsor, 是唯一一家装备GC/MS等分析仪器的流动实验室, 负责本土安全和应急环境事件的现场、快速未知化合物的测定。CT DEP应急响应队员24/7待命, 通常是救火队员、地方或联邦执法人员遇到不明的可能化学危险物时电话求助, 他们的责任是快速识别这些物质, 以便事故指挥官和执法人员作出适当的应变措施, 在这种情况下, 快速准确识别至关重要, 因为这有助于迅速决定是对无毒物质进行简单控制处理, 还是撤离周围居民。

GC/MS是快速识别挥发和半挥发有机物的选择工具, 标准EPA方法能识别超过200种环境相关的化合物, 这些方法具有很好的灵敏度, 根据保留时间和GC/MS谱图检索可以准确识别这些目标化合物。然而, 对于不能用这些方法表征的化合物, 仅仅利用GC/MS谱库检索会产生很大的不确定性。错误识别对于先遣急救员和执法者, 可能导致昂贵的、危险的甚至致命的错误响应, 确认识别的不确定性或延迟也将导致公共资源的极大浪费。

为了提高未知物正确识别的可能性, 需要一些分析方法进行二次确证分析, 如GC/MS谱库匹配后接下来利用精确质量GC/MS进行分子式确证。对于化学物识别的初期应答者, 挑战是非常严峻的, 因为分析必须具有高度的可信度, 必须快速(通常在1-3小时内), 而且必须依靠流动实验室中已有的分析仪器。对这些应用, 对于GC/MS结果的确信和准确性需要额外的确证工具。

最近在质谱数据处理上的进步, 对于在单位分辨质谱上实现准确的分子式识别显示了巨大的潜力^[1]。该应用基于精确质量数和线形校正的新技术, 在单位分辨质谱上得到精确质量数和精确的同位素峰形匹配(谱图准确度)用于分子式识别, 得到的结果与高分辨测量仪器具有很好的可比性。

本文呈现一个新方法, 通过标准GC/MS谱库检索, 并结合在标准单位质量分辨四极杆GC/MS仪器的分子式识别进行结果确认, 提高GC/MS对未知物识别的速度和准确性。方法是基于VOC分析的标准EPA方法^[2](EPA 8260B), 这里定义为EVOCA(扩展的VOC分析)。

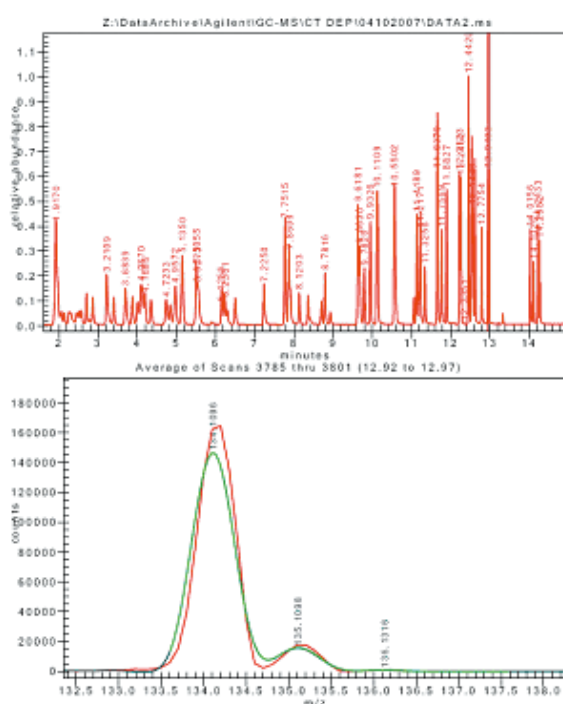
实验

使用标准EPA 8260B方法中7个标准替代化合物和内标, 建立用于评价EVOCA的测试方案, 该测试方案使用73个与环境相关的目标化合物, 在另一个单独运行中有额外17个化合物, 所以共有90个化合物用于评价该方法。

73个目标化合物测试混合物溶解在10 ml水中，每种组分的浓度约为20 ug/l，通过吹扫捕集系统和50:1的分流，每种大约4 ng的组分被引入质谱系统。17种额外化合物制成约2000 ug/ml的浓度，进样1 ul并通过相同比例的分流，每种约40 ng的组分引入质谱系统。

Agilent 6890-5973 GC/MS系统安装在CT DEP流动实验室用于全部分析。分析使用标准EPA 8260B方法，除了MS被设定为Agilent的"raw"模式（原始数据模式）采集谱图数据，原始采集模式采集和保存的MS数据是连续的，这点对于分子式识别的谱图校正是必要的。利用Agilent Chemstation软件对每种目标测试化合物在NIST 02谱库中进行谱图检索，并列出现在前面的检索结果。图1显示了73个目标化合物运行的色谱图和一个感兴趣化合物离子分析结果。额外的17种VOCs在独立的运行中使用同样方法进行分析，仅仅是样品引入方式不同。

图1 顶图显示73种目标EPA化合物的总离子流图。底图显示n-丁苯未校正（红色）和校正后及理论（绿和黑色）谱图的匹配结果，99.85%的光谱准确度匹配几乎完全重叠



每次运行后数据被装载进MassWorks软件(Cerno Bioscience, Danbury, CT)，利用表1中列出替代化合物和内标的六个选择离子校正质谱数据，得到精确质量数和线形谱图，选择的校正离子质量涵盖了整个感兴趣的质量范围，提供了全面的谱图校正信息。校正然后应用在整个运行测试上，并对73种EPA目标化合物和17个额外VOCs中每种化合物谱图进行平均。表2显示了73种目标物中的部分化合物。根据全部分析结果的精确质量信息，利用每个化合物的单一同位素峰位最大20 mDa质量偏差，对感兴趣的离子进行分子式检索。既然，方法代表真正未知物分析，设定未知物的元素组成为C、H、N、O、F、Br、Cl、S和P进行检索，这些也是影响环境和健康的相关化学品中最常见元素。一旦分子式列表产生，MassWorks校正线形谱图同位素轮廓搜索（CLIPS）的分子式检索功能被应用到选择离子，并根据谱图准确度列出可能分子式列表。谱图准确度是测量校正的线形谱图与每个候选分子式理论计算谱图匹配完美程度的指标：

$$\text{谱图准确度 (Spectral Accuracy)} = (1 - |RMSE|) * 100$$

这里RMSE是校正谱图与理论谱图误差的均方根，因此数据100是完美符合，图2说明了匹配的例子。得到的分子式结果然后利用谱库检索进行确认，以验证混合物测试的可靠性。

表1 用于质谱校正的离子和校正误差

Ion	Formula	Mass(Da)	Error (mDa)	Error (PPM)
Fragment 1,2-Dichloroethane-d4	$C_2Cl_2(^2H)_2$	65.0112	0.1	0.8
Fragment Chlorobenzene-d5	$C_6(^2H)_5$	82.07	-0.5	-6.7
Fragment 4-Bromofluorobenzene	C_6H_4F	95.0297	-0.5	-5.4
Fragment 1,4-Dichlorobenzene-d4	$C_6(^2H)_4Cl_2$	115.0253	-0.7	-5.8
1,4-Dichlorobenzene-d4	$C_6(^2H)_4Cl_2$	149.9941	0.2	1.5
Dibromofluoromethane	C_1FBr_2	189.8429	1	5.3

注：氘 (2H) 表示

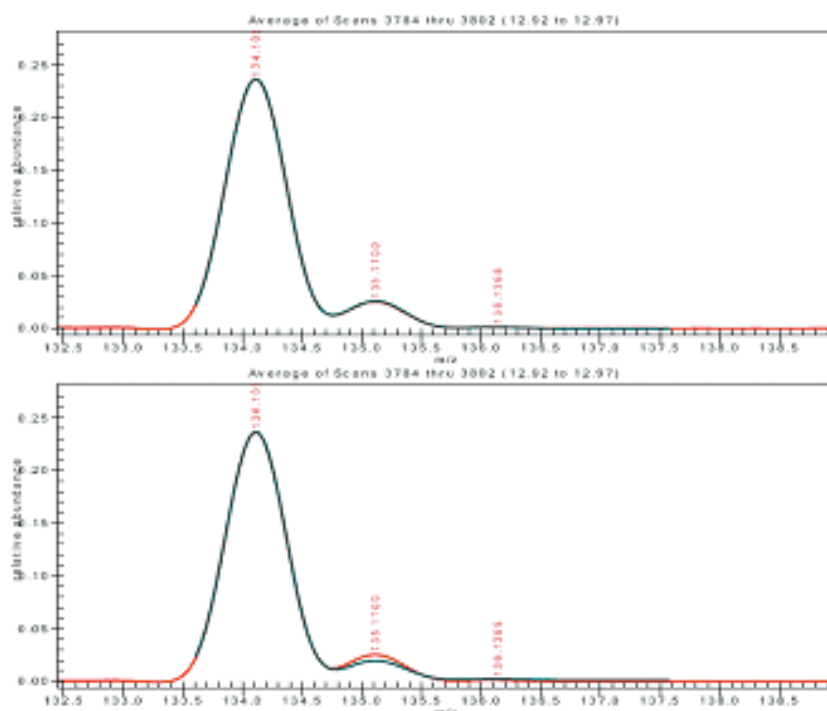


图2 CLIPS检索后n-丁苯谱图匹配结果。顶部显示谱图准确度为99.85%排名第一的校正谱图（红色）与理论谱图（黑色）的叠加图；底部显示谱图准确度为97.53%排名第二（ $C_7H_{15}OF$ ）匹配图

表2. 94种目标VOCs中的部分化合物

Compound	CAS #	Formula	Mass (Da)
Toluene	108-88-3	C_7H_8	92.0626
(trans)-1,3-Dichloropropene	10061-02-6	$C_3H_4Cl_2$	109.969
1,1,2-Trichloroethane	79-00-5	$C_2H_3Cl_3$	131.93
Tetrachloroethene	127-18-4	C_2Cl_4	163.8754
1,3-Dichloropropane	142-28-9	$C_3H_6Cl_2$	110.9768
Dibromochloromethane	124-48-1	$CHClBr_2$	205.8134
1,2-Dibromoethane	106-93-4	$C_2H_4Br_2$	185.868
Chlorobenzene	108-90-7	C_6H_5Cl	112.008
1,1,1,2-Tetrachloroethane	630-20-6	$C_2H_2Cl_4$	165.8911
Ethylbenzene	100-41-4	C_8H_{10}	106.0783
m-Xylene + p-Xylene	108-38-3	C_8H_{10}	106.0783
o-Xylene	95-47-6	C_8H_{10}	106.0783
Styrene	100-42-5	C_8H_8	104.0626
Bromoform	75-25-2	$CHBr_3$	249.7628
iso-Propylbenzene	98-82-8	C_9H_{12}	120.0939

结果和讨论

对于大部分化合物，通过NIST谱库匹配，分子离子用于确定元素组成，但在某些情况下分子离子非常弱或没有分子离子峰，在这种情况下，可以用一个或更多的碎片离子用于确证正确的分子式。73种目标化合物和17种额外VOCs质量准确度的标准偏差分别为13 mDa和7 mDa，保守设定最大20 mDa的质量窗口用于元素组成搜索，由于设定的元素组成搜索范围很宽，虽然通常有50-100待选化合物，但对于更高分子量的化合物可能会得到更多的待选化合物。即使在高分辨GC-TOF仪器，理想条件下的5 ppm^[3]质量精度，利用这些限制元素组成搜索时也会得到约20种待选分子式，而对于“真实样品”分析，质量准确度可能低2-4倍。这说明通过同位素峰形进一步限制待选分子式数量对于得到更可靠的分析结果是非常重要的。

图2说明了使用CLIPS的同位素峰形匹配。谱图校正不但校正了线形谱图也校正了质量轴位置，利用列表中分子式计算出的理论谱图与测量谱图进行准确对比，不但计算出谱图准确度值，而且可以看到同位素轮廓比较图，验证其匹配程度。对于NIST或其它谱库中不存在的真正未知物，对其进行分析也是可能的，在这种情况下，该方法至少能提供未知物的化学组成信息，结合化学及其它线索帮助识别化合物。

表3显示了结果总结。值得注意的是，对于每个测试的化合物，得到的有用分子式信息用于谱库检索结果的确证。最坏的情况，苯乙烯(C_8H_8 , MW=104.0626 Da)的分子离子(名义质量为m/z 104 Da)用于化合物识别，谱图准确度排名第五，进一步研究表明，二甲苯与苯乙烯是共流出物，它也在m/z 104 Da产生M-H₂的干扰碎片离子，苯乙烯分子离子的谱图准确度为89.3%，远低于观察的大部分离子的98%典型值及更好的99%。低谱图准确度对于不正确化合物识别是很好的指示，而质量准确度做不到这点。干扰现象很容易通过对比测量谱图和理论谱图进行证实(如图3)，明显看到不好的匹配结果，可以猜测是干扰造成的。当仔细研究和检查色谱峰后，猜测二甲苯是一个共流出物，为了证实这点，将二甲苯的分子离子和它的M-H离子包含进来重新进行CLIPS搜索，搜索自动计算这三个离子的最好匹配，得到99.75%更好谱图准确度，因此可以确认差的谱图准确度是干扰造成的。

表3 全部化合物的测试结果总结。根据谱图准确度排名，90个化合物中除了4个外正确离子都排在前两位

Total#Compounds	Ranking by Spectral Accuracy				SD mass Accuracy(mDa)
	1	2	3-5	<10	
73 VOC Target	65	4	4	0	13
17 VOC Test	16	1	0	0	7

该方法的优点是完全以现存的分析方法基础，使用替代化合物和内标，不需要额外的谱图校正标样如PFTBA，因此对现存的分析方法不需改变。这简化了分析过程且改进了谱图校正，仅需要额外的数据分析步骤就得到分子式结果，这意味该方法很容易适合其它实验室。

将CLIPS搜索应用到多个离子碎片，很容易在GC/MS上进一步提高分子式识别的确证程度(见表4)，因为碎片离子的组成元素一定来源于其分子离子。这里，对我们有利的事实是EI离子化提供了丰富的化学信息，利用这个相同的方法，我们可以解决NIST谱库检索中分子离子峰很弱或没有的情况。在完全未知物时，碎片丢失也能给出结构线索。通过识别不相关分子和碎片离子，这些信息也能用于帮助识别化合物是共流出物。

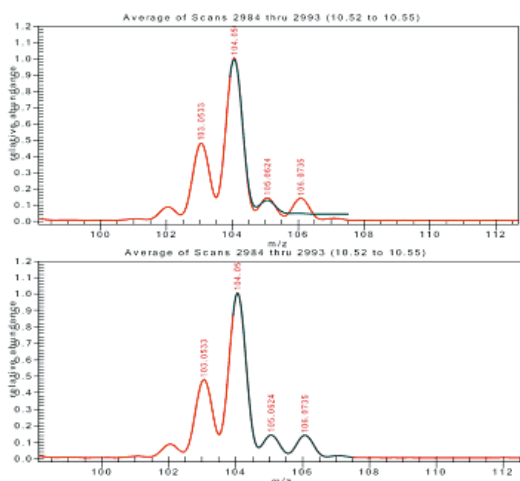


图3 顶图显示m/z 104苯乙烯离子 (C_8H_8 , 红色) 与其理论谱图 (黑色) 叠加图, 匹配结果很差, 暗示有干扰离子存在。底图包含了二甲苯 (C_8H_{10}) 和脱氢的二甲苯的匹配图, 混合物匹配的谱图准确度为99.75%, 确认存在二甲苯干扰。

表4 甲基丙烯酸乙酯两个碎片离子的CLIPS检索结果。正确的分子离子排在第二位, 通过分析另一个m/z 69离子, 正确的分子式能够根据m/z 69 碎片 (C_4H_5O) 丢失 C_2H_5O 推断出来

Search results for Molecular ion at 114						
Row	Formula	Mono Isotope	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)	Spectral Accuracy	DBE
1	$C_8H_{11}P$	114.0598	-1.6369	-14.3511	98.0144	2
2	$C_8H_{10}O_2$	114.0681	-9.8796	-86.6186	97.9428	2
3	$C_8H_9N_2F$	114.0593	-1.1264	-9.876	97.9173	3
4	$C_8H_9NO_2$	114.0555	2.6965	23.6414	97.8515	2.5
5	C_8H_9S	114.0503	7.879	69.0787	97.7656	2
6	$C_8H_9N_2O$	114.0667	-8.5369	-74.8468	97.6723	2.5

Search results for fragment at 69						
Row	Formula	Mono Isotope	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)	Spectral Accuracy	DBE
1	C_4H_5O	69.034	1.3602	19.7032	99.0029	2.5
2	$C_3H_5N_2$	69.0453	-9.8732	-143.016	98.8248	2.5
3	CHN_4	69.0201	15.2789	221.3205	98.5772	3.5
4	$C_2H_7F_2$	69.0516	-16.1816	-234.396	98.3387	-1.5
5	CH_4O_2F	69.0352	0.2174	3.1486	98.2205	-1.5
6	CH_7FP	69.0269	8.4601	122.5468	98.2194	-1.5

结论

正像表3说明的, 90个测试化合物中, 81个化合物确证的分子式在CLIPS检索列表中排在第一位, 5个化合物排在列表的第二位, 总共超过95%化合物具有很高的确证效率, 其余的四个化合物排在3-5的位置, 该结果清楚表明, 通过这个方法得到的谱图准确度和质量精度对于GC/MS谱库检索提供了高度可靠的确证。这个方法关键优势在于, 能够运行在成本较低的流动GC/MS仪器, 通常可用于个人负责的初始响应形式, 这个额外确认能力在紧急时刻甚至生命危机时刻是非常关键的。

同样方法也很容易扩展到其它应用领域, GC/MS系统对未知半挥发有机化合物 (SVOCs) 进行快速识别, 包括香精香料、药物降解、天然产物识别和污染等等。这种方式结合化学离子化GC/MS对于未知化合物结构解析提供额外的有价值信息。

参考文献

略

药物中杂质鉴定新技术——MassWorks

顾鸣^a, 李卫建^b, 欧阳伟民^{b**}

(a Cerno Bioscience, 康州, CT06810, 美国)

b 北京绿绵科技有限公司, 北京 100080 weimin_ouyang@lumtech.com.cn)

药品中少量的杂质会大大降低药物的疗效或造成不良药物反应, 因此, 鉴定这些杂质的组成, 对于监管机构来说就是一项必不可少的工作。鉴定这些杂质, 首先需要测定这些它们的元素组成。过去, 我们只能借助高分辨率质谱(诸如qTOF、FT-ICR、或Orbitrap)测定精确质量数, 然后确定这些杂质的元素组成——分子式。现在, 我们借助MassWorks处理技术, 可以在低分辨率质谱上测定精确质量数, 然后结合MassWorks同位素峰形检索技术, 可以更加准确地测定目标物的分子式, 以准确鉴定药物中杂质的组成。

实验

辛伐他汀由土曲霉菌发酵生物合成, 是一种降血脂药物, 属于一类药品的“他汀”类, 用于控制高胆固醇血症, 并防止心血管疾病。将市场购买的辛伐他汀药物, 用超高压液相色谱(UPLC)(Waters, Milford, MA)分离, 单四级质谱仪(Waters Acquity SQD)检测。色谱分离条件: 进样量10ul(辛伐他汀的浓度为50mg/L, 杂质浓度约为0.5mg/L); C18柱; 色谱分离条件见表1。质谱采集方式: profile mode; 扫描速度: 1000 amu/s; 扫描范围: 380 to 520。用MassWorks software (Cerno Bioscience, Danbury)对MassLynx采集的质谱数据进行处理, 测定目标物的精确质量数, 并识别目标物的分子式。

结果与讨论

图1是样品的总离子流图, 由于采用了UPLC进行分离, 全部成分在9分钟之内全部出完, 4.4分钟的主峰即辛伐他汀, 其前后的小峰为杂质峰, 具体的保留时间见表2。

表1 色谱分离条件

Time(min)	Flow Rate	%A	%B
1. Initial	0.600	75.0	25.0
2. 7.00	0.600	10.0	90.0
3. 8.00	0.600	10.0	90.0
4. 8.20	0.600	75.0	25.0
5. 9.00	0.600	75.0	25.0

注: A: 0.1% HCOOH in Water

B: ACN

辛伐他汀经ESI被离子化产生 $[M+H]^+$ 、 $[M+N_4H]^+$ 、 $[M+K]^+$ 三种离子, 其m/z分别为419、436和457。由于辛伐他汀的元素组成是已知的, 因此我们以它的离子作为MassWorks数据处理的内标, 建立校正函数, 对m/z和峰形进行校正。图2是MassWorks处理校正结果, 质量精度和谱图精度是衡量校正性能的重要指标, 3种离子的相对质量误差均小于5ppm, 谱图精度达到98%, 如此高的同位素峰形谱图精度, 为目标物的校正和同位素峰形检索元素组成的可靠性和准确性, 提供了保证。

将建立的校正函数应用到整个液相色谱/质谱数据, 以鉴定辛伐他汀杂质的元素组成。检索前, 设定目标物可能包含的元素为C、H、N、O、K、Cl和S, 原子数上限分别设定为30、200、10、10、1、5、5, 下限为0; 质量误差上限为10 mDa。尽管大部分杂质与主成份组成相似, 可能产生 $[M+H]^+$ 、 $[M+N_4H]^+$ 、 $[M+K]^+$ 3种

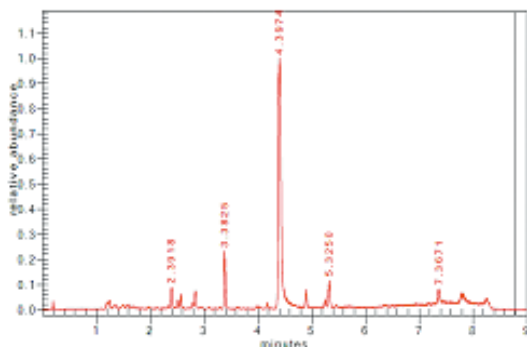


图1辛伐他汀药物总离子流图



图2辛伐他汀离子校正结果

离子，但由于部分离子的丰度太低，我们选择丰度相对较高的 $[M+H]^+$ 或 $[M+N H]^+$ 检索，以识别杂质的分子式。

MassWorks测定结果见表1，除保留时间为4.0分钟的杂质，由于信噪比低导致谱图精度相对较差，结果导致目标物的分子式位于待选分子式（共34个）的第4位外；其余的杂质均位于各自待选分子式的前两位，谱图精度均高于97.2%，质量误差小于5.7mDa。

表2 MassWorks测定的杂质分子式结果

分子式	质量/Da	误差/mDa	相对误差/ppm	谱图精度	保留时间	排序	待选个数
C25H44NO5	438.3219	4.4	10.1	98.4	4.88	1	34
C25H40NO4	418.2957	5.7	13.7	99.1	5.33	1	28
C25H41O6	437.2903	1.8	4.1	99.4	3.38	1	49
C24H40NO5	422.2906	8.3	19.8	94.5	4.04	4	34
C24H40NO5	422.2906	7.1	16.9	98.1	3.95	3	32
C26H44NO5	450.3219	-0.4	-0.8	97.3	5.24	1	33
C25H40NO5	434.2906	-1.4	-3.1	97.2	4.18	2	36

在用MassWorks处理液相色谱/质谱数据，鉴定目标物分子式的时候，我们可以看到，同时利用质量精度和谱图精度进行检索，其效果远高于仅用质量精度的结果。表3和表4列出了这两种方法对辛伐他汀酸测定的结果，质量精度结合谱图精度进行检索时，辛伐他汀酸由于其谱图精度为99.4%，远高于其它待选分子式，位于第1位；而当仅利用质量精度进行检索时，辛伐他汀酸因其质量误差为1.8mDa，仅位于待选分子式的第9位。因此，谱图精度是未知物分子式识别的重要手段。

表3 MassWorks以质量精度和谱图精度同时检索结果

排序	分子式	质量/Da	误差/mDa	相对误差/ppm	谱图精度	不饱和度
1	C25H41O6	437.2903	1.8	4.1	99.4	5.5
2	C22H33N10	437.289	0.5	1.1	98.8	11.5
3	C21H37N6O4	437.2876	-0.9	-2.0	98	6.5
4	C26H37N4O2	437.2917	3.2	7.2	97.8	10.5
5	C27H37N2O3	437.2804	-8.1	-18.5	97.5	10.5
6	C23H41N4O2S	437.295	6.5	14.9	97.1	5.5
7	C24H41N2O3S	437.2838	-4.7	-10.8	96.9	5.5
8	C20H37N8OS	437.2811	-7.4	-16.9	96.7	6.5
9	C19H37N10S	437.2923	3.8	8.8	96.6	6.5
10	C20H41N2O8	437.2863	-2.2	-5.1	96.1	1.5

表4 仅以质量精度为依据辛伐他汀酸检索结果

排序	分子式	质量/Da	误差/mDa	相对误差/ppm	谱图精度	不饱和度
1	C22H33N10	437.289	0.5	1.1	98.8	11.5
2	C29H41OS	437.2878	-0.7	-1.6	95.7	9.5
3	C21H37N6O4	437.2876	-0.9	-2.0	98.2	6.5
4	C21H42N4O3K	437.2894	0.9	2.1	94	2.5
5	C20H42N4O4Cl	437.2895	1.0	2.2	73	1.5
6	C21H45N2O3S2	437.2872	-1.3	-3.1	93	0.5
7	C16H38N10O2Cl	437.2868	-1.7	-3.9	72.8	2.5
8	C17H38N10OK	437.2867	-1.8	-4.1	93.1	3.5
9	C25H41O6	437.2903	1.8	4.1	99.5	5.5
10	C20H41N2O8	437.2863	-2.2	-5.1	96.4	1.5

结论

UPLC串接单四级杆质谱采集数据后,用Massworks对数据进行处理,通过质量精度和光谱精度,可以准确鉴定辛伐他汀药物中所有杂质的组成。

分子式精确的同位素分布中蕴藏的指纹信息,是成功鉴定化合物分子式的重要依据。单四级杆的高动态范围,有助于产生精确的同位素分布。UPLC在色谱上的高分离度,可以补偿传统单四级质谱在质谱分离的低分辨。因此,借助新的分子式识别技术——Massworks,单四杆质谱可以用来准确地识别药物中杂质的组成,且单四杆质谱使用方便,价格便宜。

参考文献

- [1] Wang, Y.; Prest, H. Chromatography (Japan) 2006, 27, 135.
- [2] Gu, M; etal, RCM 2006, 20, 764.
- [3] Kuehl, D.; Wang, Y. ASMS 2008, Poster PM 013
- [4] McLafferty, F; Turecek, F. Interpretation of Mass Spectra, 4th edition, USB, 1993