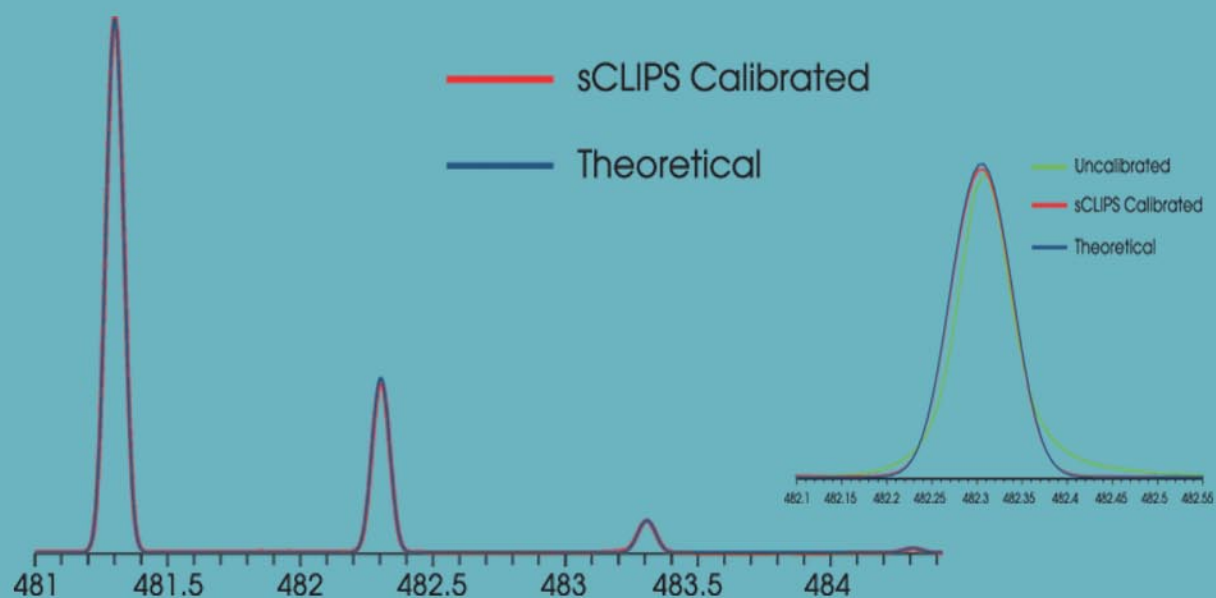


质谱数据处理软件应用文集



前言

质谱由于灵敏度高、速度快、选择性高、适于与色谱联用、直接给出分子量、分子碎片等丰富信息等特点，近年来被广泛地应用于各个领域。

质谱最基本的两大能力是定性和定量。在未知物定性领域，我们通常通过谱库检索或者高精度质谱的元素组成预测能力，去获得最可能的几个匹配结果，再结合我们的经验和其它谱学的结果，甚至最终人工合成化合物去确认未知化合物。但制约我们、干扰我们人为判断的最重要难题是：谱库检索或元素组成预测出的结果，是不是可靠的？是不是我们预期的？为什么常常排在检索结果列表第一位的，并不是我们预期的结果？制约我们的第二个难题是：如果没有谱库，我们就只能依赖高精度质谱的元素组成预测结果。这时，制约我们的主要问题是：能实现高精度质量测定的质谱，在仪器成本、使用成本、人员成本上可能都超出了我们的预算。

即使在定量领域，目前质谱的发展潮流，尤其是在药物残留检测、食品安全等方面，也越来越强调定量能力和定性能力相结合，一次实验同时给出定性定量结果。因为在严格的受控列表检查范围以外，不法分子仍然可能添加一些未知的、不在受控列表中的有毒有害物质。比如，在这次三聚氰胺事件之后，我们每个分析工作者、尤其是质谱工作者，是否都会在心中追问：在现有的受控列表之外，还会出现其它的有毒有害物质么？为什么我们不能利用质谱的定性能力去早日检出、防患于未然呢？

因此，在质谱学中，我们永远无法回避的是定性的问题。

下面的章节里，我们将主要介绍质谱定性利器——**MassWorks** 的一些应用实例，它展现了 **MassWorks** 的几个特点：

- 1、在成本较低的常规四极杆质谱仪器上，实现精确质量测定，从而获得更好的定性结果
- 2、操作简单、运行稳定
- 3、在 **GC/MS** 联用于未知有毒有害物质检测时，增强定性确认能力
- 4、四极杆型 **LC/MS** 联用，用于药物代谢物鉴定
- 5、在 **TOF** 等类型的高分辨质谱上，使用同位素峰形校正技术，使元素组成预测的能力大幅提高

本应用文集收录了十篇 **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。

绿绵科技有限公司市场部
二零零八年十月

目 录

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	1
超越质量精度-质谱仪器上被忽视了的谱图准确度	5
单四极杆 GC/MS 测定精确质量在未知物结构解析中的运用	8
弥补理论与实验质谱图之间的差距	11
用单四极杆质谱进行精确质量测定	14
单四极杆 GC-MS 系统进行分子式测定的校正稳定性	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	25
AccuTOF DART 系统的峰形校正和分子式测定.....	31
精确质量数离子过滤在单分辨液质联中用于代谢物的鉴定	36
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	44

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)

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。所以仅仅依靠精测质量一个条件，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, $C_{28}H_{60}N^+$, 精确质量 410.4726Da) 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 50-550Da，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 410.4722Da，质量误差为-0.9ppm。

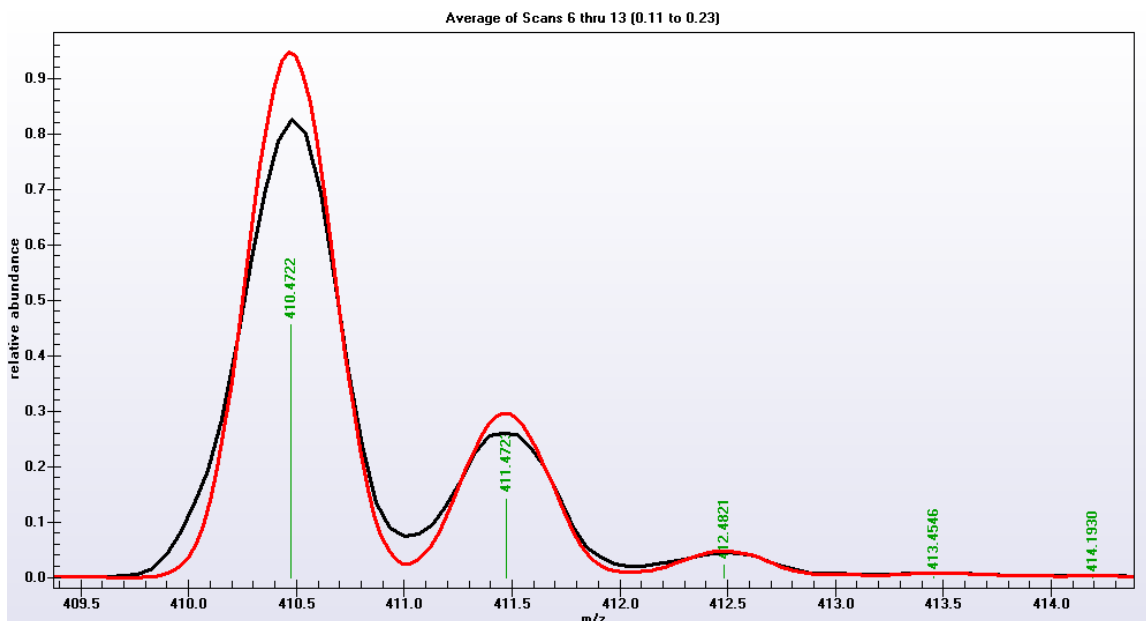


图 1. 标准离子的校正前质谱图（黑线）和校正后质谱图（红线）

3.结果和讨论

上面所述的 0.9ppm 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。

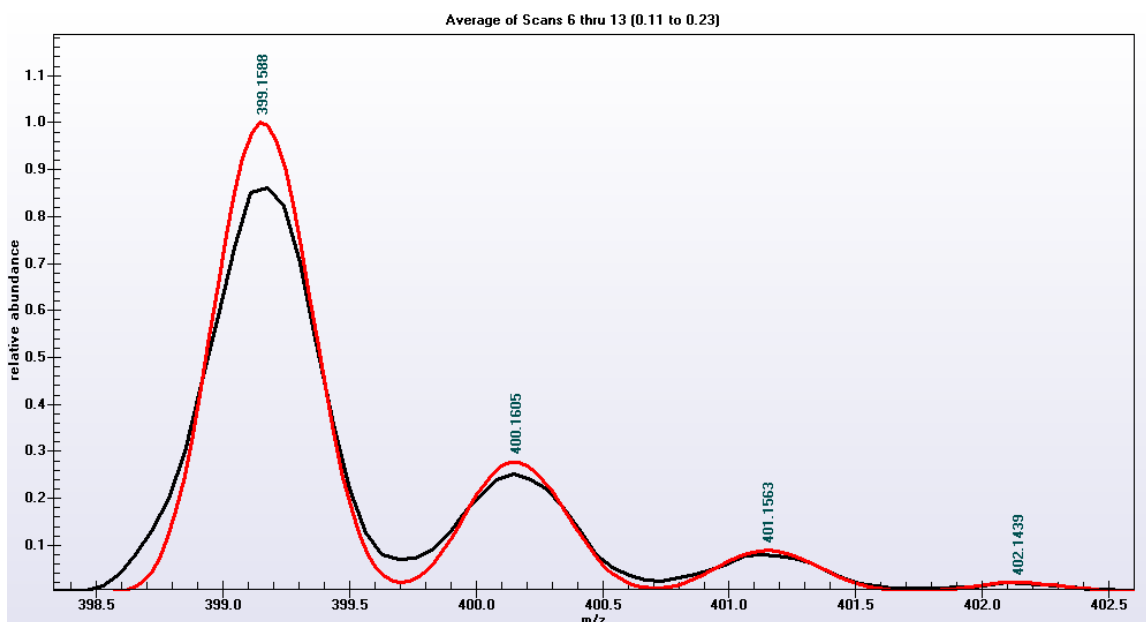


图 2. 未知离子的校正前质谱图（黑线）和校正后质谱图（红线）

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 PF ₂ Na	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

超越质量精度：质谱仪器上被忽视了的谱图准确度

Don Kueh, Wang Yong-dong
(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]。

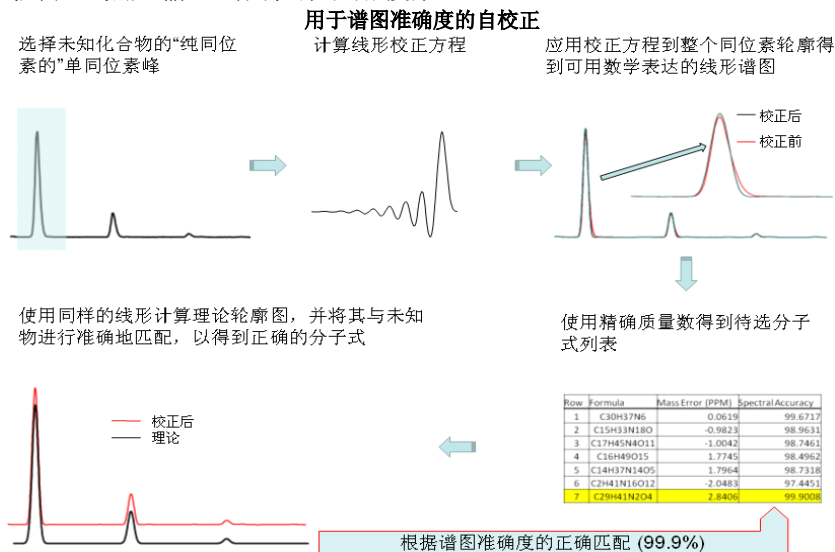
这里开发了一个用于高分辨质谱的新方法，可以自校正其线形谱图，将谱图数据校正为可用数学表达的线形图型，产生具有高谱图精度的完美轮廓谱图，这个高精度的同位素轮廓匹配可以实现确定的元素组成。在这个工作中，利用不同类型的高分辨质谱，评价了用于元素组成结果的谱图准确度，说明了谱图准确度对于原则组成结果的重要优势。

方法

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

质量范围从 **152** 到 **734 Daltons** 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 $(1-\text{RMSE}) * 100$ ，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。



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

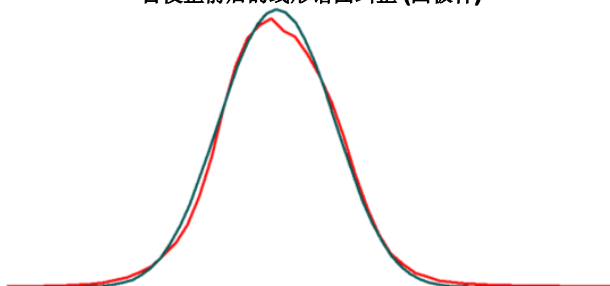
micrOTOF (TOF) 的搜索结果

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。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

单四极杆 **GC/MS** 测定精确质量在未知物结构解析中的运用

Joseph Mick, Todd Gillespie
(Eli Lilly & Company, Indianapolis, IN)

概览

- 用单四极杆 **GC/MS** 测定精确质量，获得元素组成结果 (**ECD**)，对未知物进行定性或确证
- 采用第二种方法，采用校正同位素峰形对由精确质量获得的元素组成进行匹配，大大提高元素组成结果的准确识别能力
- 一项新颖的质谱技术，该技术可以在通用的单分辨力质谱仪上获得精确质量数，并可实现未知物元素组成的准确识别

引言

单四极杆气质联用仪因其价格便宜，操作简单，灵敏度高，适用于多种类型化合物等特点，从问世以来得到广泛应用。尽管目前市场上各种质谱数据库的出现，使其使用更加便利，但随着研究的不断深入，仍然有大量的化合物和杂质成分，在这些商品库中是找不到的，这就给我们的分析带来了不便。

Massworks 可以处理各种单分辨力 **GC/MS** 或 **LC/MS** 采集的数据，获得目标物的精确质量，并对其元素组成结果进行准确识别，最终对目标物进行定性确证。该技术的使用可以大大节省数据处理的时间，也可为用户节约大量的经费。

仪器和方法

GC/MS : Agilent 6890N/ 5973 MSD, 软件版本 D02. 00. 275;

首先，对不同浓度的 11 种化合物进行测定，然后对一原料药进行测定，对原料药中的杂质进行定性分析。

数据采集：Data acquisition : Raw scan; Data Threshold: 0; Acquisition Rate: ≤ 0.1 ; Mass Rang: 30-400。

数据处理步骤

- 1) 系统校正数据的采集;
- 2) 样品数据的采集;
- 3) 在 **MassWorks™** 软件中打开校正数据;
- 4) 选择一段质谱图，并产生校正离子列表;
- 5) 软件处理产生校正文件;
- 6) 打开样品数据，选定校正文件;
- 7) 软件对样品数据自动处理后，得到目标物的精确质量数。

结果与讨论

以 **Massworks** 测定的精确质量为基准，按表 1 设定的参数（离子电荷数为 1、质量允许误差为 $\pm 9\text{mD}$ ）进行检索，得到待选的元素组成结果列表。尽管质量精度已达到 9mD ，待选的元素组成的数目仍较多。同位素峰形轮廓匹配，可以帮助我们从质量数相近的分子式中筛选出真正目标物的元素组成结果，将其元素组成排列于待选元素组成的前列，在绝大多数情况下往往能排第一位。表 2 是测试化合物经 **Massworks** 处理后得到的结果，8 种目标的元素组成结果均排在待选化学式的第一位，测定的精确质量数误差在 $\pm 7\text{mD}$ 以内。

表 1、化学式检索参数设置

Charge	1	
Mass Tolerance (mDa)	9	
Electron State	Both	
Profile Mass Start (Da)	-0.5	
Profile Mass End	3.5	
Element	Minimum	Maximum
Carbon	0	34
Hydrogen	0	50
Nitrogen	0	10
Oxygen	0	10
Chlorine	0	3
Fluorine*	0	3

表 2、8 种测试化合物 Massworks 检索结果汇总

GC/MS	Ranking of Correct Formula	Formula	Theoretical	Measure	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)
Hexadecanoic acid methyl ester	1st of 68	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.2559	270.2489	-7.0	-25.8
4-chloro-1,1-biphenyl	1st of 41	C ₁₂ H ₉ Cl	188.0393	188.0339	-5.4	-28.6
biphenyl	1st of 25	C ₁₂ H ₁₀	154.0783	154.0816	3.3	21.7
methylene chloride	1st of 2	CH ₂ Cl ₂	83.9534	83.9458	-7.6	-90.0
THF	1st of 7	C ₄ H ₈ O	72.0575	72.0507	-6.8	-94.6
Heptane	1st of 6	C ₇ H ₁₆	100.1252	100.1232	-2.0	-20.0
xylene	1st of 12	C ₈ H ₁₀	106.0783	106.0794	1.1	10.8
anisole	1st of 10	C ₇ H ₈ O	108.0575	108.0582	0.7	6.3

质谱仪得到的原始轮廓图，峰形常常存在一定程度的扭曲，而非理论的正态分布，这就给同位素峰形匹配带来了一定得困难。Massworks 在进行同位素峰形匹配前，将原始轮廓图进行校正，得到校正质谱图（图 1），然后以校正质谱图与理论质谱图进行匹配，从而提高匹配率，大大提高目标物的排序。

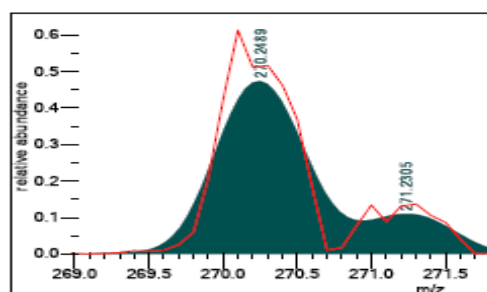


图 1、原始轮廓质谱图与校正质谱图

采用同位素峰形匹配，从另一个角度可以大大提高分子式识别的准确性。表 3 是棕榈酸乙酯用 Massworks 处理后，得到的检索结果，尽管测定的精确质量相对于其它 4 个化合物，质量误差最大-7.0 mD，但经过同位素峰形匹配后，其排序就提高至第一位，因为其谱图准确度（Spectral Accuracy）最高 98.4169%。

表 3、棕榈酸乙酯 Massworks 检索结果

Spectral Accuracy	Formula	Theoretical	Mass Error (mDa)	Mass Error (ppm)
98.4169	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.2559	-7.0	-25.8
98.2368	C ₁₆ H ₃₂ NO ₂	270.2433	5.6	20.7
98.1412	C ₁₆ H ₃₂ N ₃ O	270.2545	-5.6	-20.9
97.9524	C ₁₄ H ₃₀ N ₄ O	270.2420	6.9	25.7
97.8514	C ₁₃ H ₃₀ N ₆	270.2532	-4.3	-15.9

众所周知，样品的信噪比（S/N）低，测定的质量精度就差，从而给准确性目标物的元素组成带来了困难。表 4 是 3 个化合物在不同浓度下，用 Massworks 测定精确质量，并进行元素组成检索的结果，dodecane 由于 S/N 最低 23，测定的质量误差也最大 -49.2 mD，其化学式在待选 137 个元素组成中的排序也相对靠后，排第 11 位；t-butyl methyl ether 和 2-butanone 在高信噪比（1923、431）时，测定的质量误差较小（-0.1、-0.8 mD），目标物的元素组成均排在第一位，而低信噪比，质量精度和排序相对比较差。

表 4、目标物检索结果排序与信噪比的关系

GC/MS	Ranking of Correct Formula	Formula	Theoretical	Measure	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)	Peak to Peak S/N
t-butyl methyl ether	2nd of 5	C ₄ H ₈ O	73.0653	73.0682	2.9	39.1	53
t-butyl methyl ether	1st of 4	C ₄ H ₈ O	73.0653	73.0652	-0.1	-1.9	1923
2-butanone	3rd of 7	C ₄ H ₈ O	72.0575	72.0508	-6.7	-93.2	40
2-butanone	1st of 4	C ₄ H ₈ O	72.0575	72.0567	-0.8	-11.3	431
dodecane	11th of 137	C ₁₂ H ₂₆	170.2035	170.1543	-49.2	-288.9	23

以 Massworks 测定的精确质量为准，参数设定除将氯换成氟，其余与表 1 相同，得到原料药杂质及其碎片的正确元素组成结果（表 5）。尽管部分杂质的分子离子 S/N 较碎片离子小，但我们可以根据测定的碎片的精确质量数和正确元素组成确定其母离子的元素组成，且碎片离子的元素组成结果有助于杂质的结构解析。

表 5、原料药杂质元素组成 Massworks 检索结果汇总

Impurities	Ranking of Correct Formula	Formula	Theoretical	Measure	Mass Error (mDa)	Mass Error (PPM)
fluorobenzyl alcohol	2nd of 24	C ₇ H ₇ OF	126.0481	126.0428	-5.3	-42.0
fluorobiphenyl	2nd of 45	C ₁₂ H ₉ F	172.0688	172.0774	8.6	49.8
difluorobiphenyl	2nd of 57	C ₁₂ H ₈ F ₂	190.0594	190.0624	3	15.7
Fragment of impurity m/z 184*	1st of 22	C ₈ H ₇ F	122.0532	122.056	2.8	23.1
Fragment of impurity m/z 184*	1st of 16	C ₇ H ₆ F	109.0454	109.0521	6.7	61.9
Fragment of impurity m/z 184*	1st of 16	C ₈ H ₇	103.0548	103.0551	0.3	3.2
impurity m/z 156**	1st of 38	C ₈ H ₉ O ₂ F	156.0587	156.0678	9.1	58.6
impurity m/z 166***	1st of 40	C ₁₀ H ₁₁ OF	166.0794	166.0843	4.9	29.5
Fragment of impurity m/z 166***	1st of 42	C ₁₀ H ₁₀ OF	165.0716	165.0814	9.8	59.6

- * 做为杂质离子 184 的三个碎片离子（122、109、103），其丰度远高于其分子离子（184），通过 Massworks 测定这三个碎片离子的元素组成有助于确定该杂质分子离子的元素组成，同时有助于其结构的解析；
- ** 该杂质来自于原材料；
- *** 离子 165 是杂质 166 掉了 1 个氢原子的碎片离子。

结论

- Massworks 可以在单分辨力 GC/MS 上实现未知物的元素组成测定；
- 目标离子的信噪比达 100 左右，Massworks 测得的未知物的元素组成排在待选化学式的前三位；
- 当信噪比较低，测定的精确质量的误差就较大，待选的元素组成也就较多，给我们准确地定性未知物的元素组成带来了困难；同位素峰形匹配检索，为我们准确识别未知物的元素组成提供了新途径。

弥补理论与实验质谱图之间的差距

Don Kueh

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

概览

- 仅仅依靠精确质量，即使是1 ppm的精度，通常也不能得到明确的元素组成结果（ECD或分子式识别）
- 质谱轮廓数据的线形校正，能够与理论谱图进行高精度的匹配（谱图准确度），从而实现分子式的明确识别
- 不同类型的质量分析器、检测器和后处理方法，能够影响谱图准确度，因此必须仔细考虑

引言

质谱是一个能够给定离子的准确理论值的少有几个测量技术之一，这完全基于已知的元素丰度。这种理论计算出来的质谱图，相当于由具有无限高分辨能力或 $\text{FWHM}=0$ 时的虚拟质谱仪器得到。然而，来自任何物理仪器，从单四极杆质谱到 FT ICR MS 的质谱信号，相应都具有有限的分辨能力。因此，将这些仪器得到的测量质谱与理论质谱进行准确比较是非常重要的，不但可以大大提高元素组成的检测能力^[1-4]，而且能够可靠的对叠加的离子信号进行去卷积处理。

实验

利用前面采集并保存下来的数据，提供了不同质量分析器、采集速度、离子化技术、浓度、条件和不同化合物的测试数据。全部数据在连续（轮廓）数据模式下采集，并转移到MassWorks软件^[5]进行校正、分析和生成分析报告。

由于在低分辨质谱，如LC/MS或GC/MS单四极杆质谱上同位素峰相互叠加，峰形信息不容易从质谱的轮廓数据中提取出来，因此，必须对已知元素组成的校正离子进行数学处理，才能间接地得到峰形信息。而更高分辨的质谱系统，如qTOF或FT ICR MS的未知离子的单同位素峰能够与其它同位素峰很好地分离，因此，不需要使用内标或外标，就可以直接测量得到峰形函数。图1说明了这两种线形校正方法。

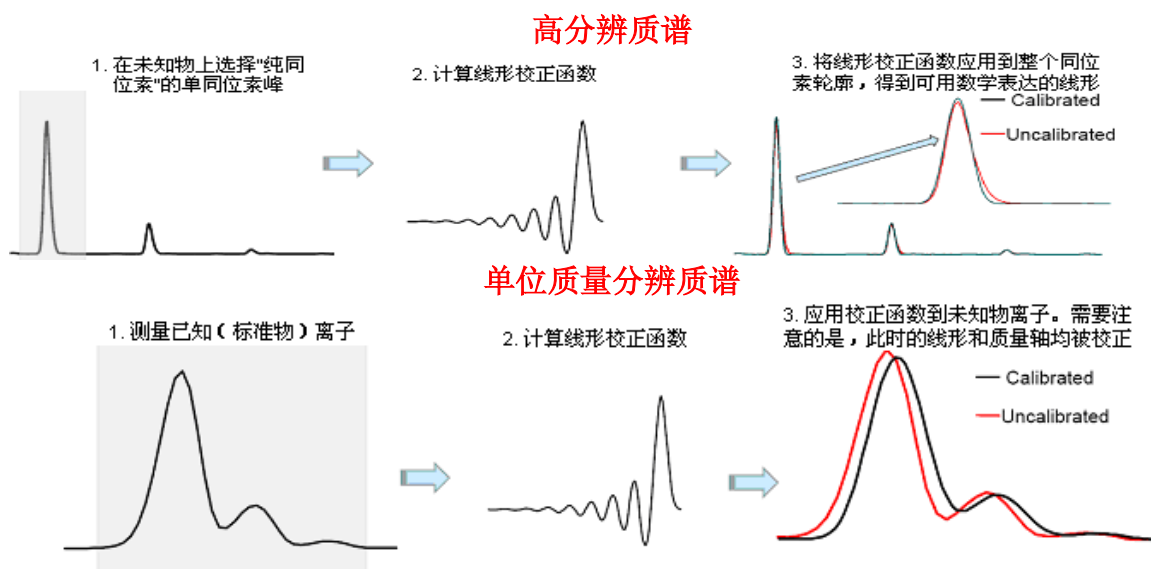


图1. 线形校正

一旦数据被线形校正后，根据仪器的精确质量能力，生成待选分子式列表，并利用校正离子产生的线形计算其理论谱图，然后，校正谱图与计算得到的理论谱图进行比较匹配，得到谱图准确度用于识别唯一的分子式（见图2）。

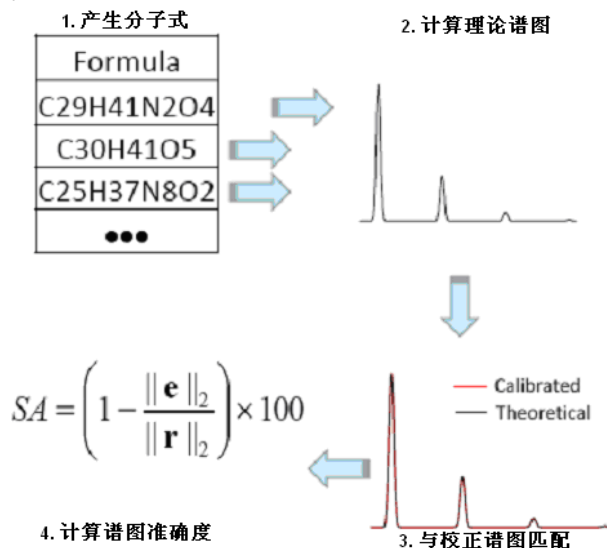


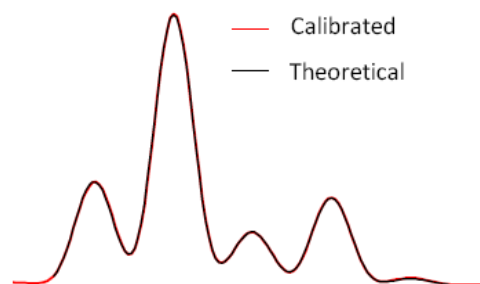
图 2. 计算谱图准确度

结果与讨论

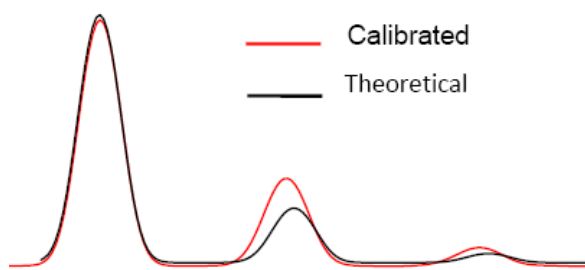
四极杆质谱

大部分四极杆可以得到很好的谱图准确度，因此，利用其单位质量分辨数据和适中的质量精度（+/- 10 mDa），能够实现高度确信的分子式识别。某些系统具有有限的动态范围或仪器结构，因此会得到相对较差的结果。如果提供足够的信噪比，高分辨和低分辨 GC/MS 和 LC/MS 系统，能够得到高达 99.5% 的谱图准确度。

对于已知的干扰物，或诸如共存的M-H、M或M+H的碎片干扰，匹配过程也能够很容易解决（上图为M-H共存干扰物的GC/MS对比图）。



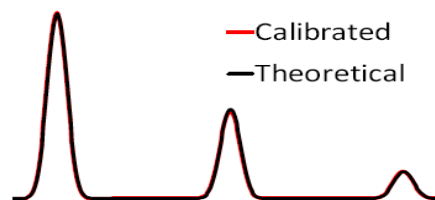
离子阱质谱



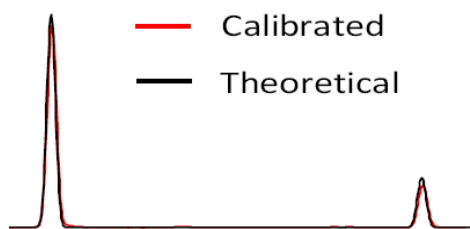
离子阱通常不能得到类似四极杆的谱图准确度，左图显示了校正谱图与理论谱图的放大图，在同位素峰强度和质量位置上显示了较大的偏差，这个偏差是由于空间电荷效应造成的。仔细控制离子注入时间和离子强度，离子阱也能得到可接受的结果，离子阱设计也是一个重要影响因素。

TOF

如果仔细操作，避免信号饱和，TOF能够提供很好的谱图准确度。LC TOF和GC TOF系统能够得到高达99.5%的谱图准确度，在很多情况下，能够提供唯一的分子式识别。



FT ICR和OrbiTrap



FT ICR和OrbiTrap仪器提供了足够的谱图准确度，始终能够将正确的分子式排在待选列表中的第一位。谱图准确度绝对值没有四极杆和TOF仪器高，特别离子强度较弱时，主要原因可能是仪器内部更低的离子阈值设置。上图显示了M+2和M+3峰的对比，显示比理论预测更低的同位素强度。可望在仪器数据处理上进行小小修改，然后大大提供谱图准确度，在这类仪器上可以实现未知物明确的分子式识别。尽管低的绝对谱图准确度，但谱图准确度排名仍大大改善了分子式识别的结果。

结论

- 利用MassWorks进行合适的线形校正，可以精确地匹配测量谱图与理论谱图，大大提高高分辨质谱的分子式识别能力，也能够单位质量分辨质谱上实现分子式识别
- MassWorks 在进行分子式识别测定时，谱图准确度值可以反映仪器硬件的状态，硬件状态好，谱图准确度高；仪器硬件和固件的改进，可以提高谱图准确度，得到更准确的理论与校正谱图的匹配结果

参考文献

- [1] Kind, T. BMC Bioinformatics 2006, 7, 234.
- [2] S. M. Rock Anal. Chem.; 1951; 23; 261-268.
- [3] RoussisSG, ProulxR Anal. Chem., 75 (6), 1470-1482, 2003.
- [4] Evans, J. E.; Jurinski, N. B. Anal. Chem. 1975, 47, 961-963.
- [5] MassWorkssoftware, CernoBioscience, Danbury, CT 06810

用单四极杆质谱进行精确质量测定

Harry Prest
(Agilent Technologies, Santa Clara, CA 95051, USA)

——发表于 *Chromatography, Vol. 27 No. 3 (2006)*

摘要：众所周知，单位质量分辨的质谱仪（如单四极杆质谱仪），质荷比的测定仅仅只能准确到 0.1-0.5 Da，因此只能靠测定大致的质量数来进行定性分析。本文介绍了一种新颖的质谱校正技术——MassWorks™，它不仅校正质量轴，同时对质谱峰形函数进行校正。通过质量轴校正，即便是在单位质量分辨的质谱上也能得到 0.00x Da 高质量精度，这样使得单分辨质谱仪通过色谱分离后，对未知离子或离子碎片进行元素组成分析成为可能；软件的同位素峰形线性轮廓校正（CLIPS™）通过利用同位素分布信息，可以大大提高元素组成分析的精度，进一步提高单分辨质谱上测定未知物分子式的能力。

关键词：精确质量数，质谱（MS），单位质量分辨，元素组成，同位素分布，校正

绪论

单四极杆气质联用仪因其价格便宜，操作简单，灵敏度高，适用于多种类型化合物，便携甚至可以移动使用等特点，已成为环境和其他应用领域的一件常规分析仪器。借助谱库检索（如 NIST 谱库）该类仪器广泛用于已知化合物的常规分析，由于其相对的单位质量分辨和不具有串联质谱功能，该类仪器往往还不满足未知化合物或新化合物定性分析的要求。

由文献报导可知，即使是单位质量分辨的质谱也可以获得很高的质量精度，这使得我们对未知物或其碎片的元素组成进行分析成为可能，并且大大促进了代谢物或者其他化合物的鉴定分析能力。化合物的元素组成鉴定是 qTOF 或 FTMS 等高分辨质谱系统的代表性功能，但这类仪器使用和维护成本较高。在不改变硬件系统基础上，更精细和全面的第三方质谱校正软件，可以帮助我们在常规的单位质量分辨仪器上获得必要的高质量精度。软件在 GC/MS 的应用中，仪器自带的校正标样（如 PFTBA），可以直接用于校正方法，只是需要在测定前对部分设定值进行恰当的调整。此外，由于 EI 离子化方式广泛应用于 GC/MS 系统，在很多情况下，分子离子碎裂成一些明显的碎片离子，通过对这些离子的高精确质量测定可获得非常准确的分子离子和碎片结构的额外信息。

本文演示了杀虫剂在安捷伦 5973N MSD 上测定后，应用 MassWorks™ 软件进行校正，来获得分子离子和碎片离子的精确质量和元素组成的过程。在不具备高分辨质谱或串联质谱的情况下，用单四极杆质谱测定后，采用 MassWorks™ 软件进行校正，可以大大提高常规分析的定性能力。

实验部分

样品信息：PFTBA 校正标样和 17 种有机氯杀虫剂混合标样（1ng/ul），含有 50ng/ul 的 PCB 209（decachlorobiphenyl, C₁₂Cl₁₀）

质谱条件：PFTBA 和混标在 50-550 m/z 质量范围内以 2² 的扫描速率（A/D 样品数=4）获得原始扫描数据。

数据获得与分析：图 1 显示了数据处理的概要流程。把控制阀调到 ON 位置连续注入 5 分钟以获得 PFTBA 校正标样的轮廓图。类似的，在混合样品 GC/MS 分析时，在整个 19 分钟的 GC 分离程序中反复收集质谱轮廓模式扫描信息。使用 Cerno Bioscience 的 MassWorks™ 软件中专门的时间窗口，从 PFTBA 质谱扫描的平均结果进行精心设计和全面的质谱校正。这个独特的校正过程既校正了质量轴，同时校正了质谱峰形函数，这是获得质量精度的关键。接着将这个校正函数应用到每个 GC/MS 的扫描数据文档，通过一个数学定义的峰形对称方法锁定在精确的质量数值，将每个原始质谱图转换

成校正之后的格式。接着可以将峰检测应用于精确和可靠的计算分子离子/它们的碎片离子的质量位置，以通过在列出的小质量偏差目录范围内的可能结构来实现化合物鉴定的目的。这个可能的目录可以通过在 MassWorks 中的 CLIPST[™] (Calibrated Line-shape Isotope Profile Search) 进一步优化和大大的收缩范围，它通过整个同位素轮廓图来确定元素组成，高选择能力通过全面的质谱校正获得唯一的可能性^[7]。

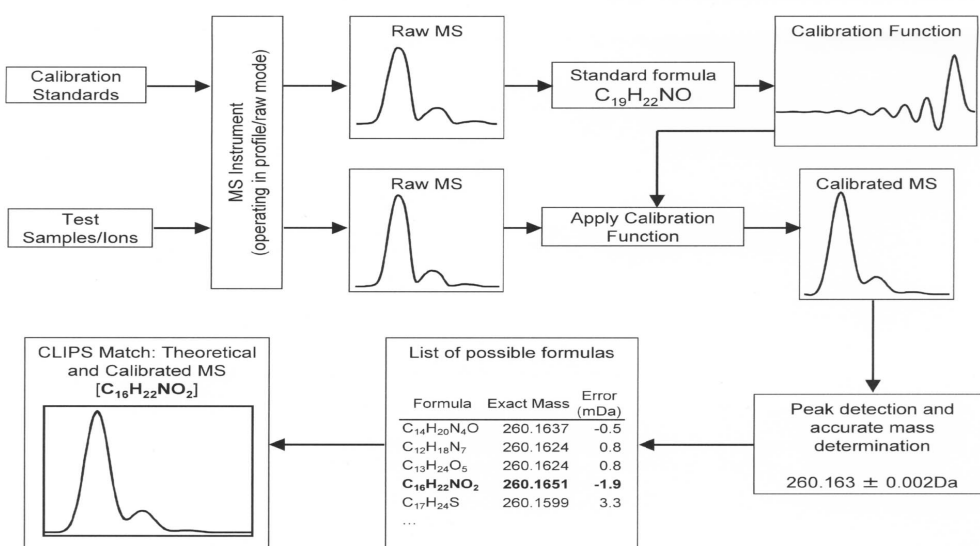


Figure 1. The general flow of MassWorks calibration and its elemental composition determination process

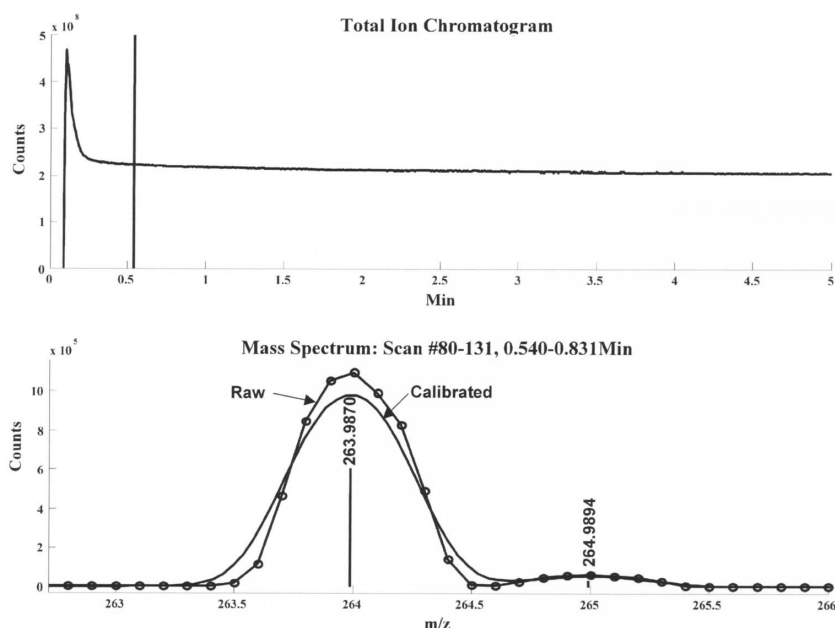


Figure 2. The raw and the calibrated mass spectrum for one of the calibration ions

结果与讨论

PFTBA 包括分子离子的 12 个离子被用来进行全面的 MassWorks 校正。表 1 列出的是它们的元素组成和理论计算的精确质量。校正将原始质谱扫描转换为完全校准的质谱扫描，平均扫描为 80—

131。图 2 是同一校正离子的原始和校准质谱图。这个校正可以应用到这个过程中所有扫描以检查质量精度。一旦校准了一个质谱扫描，即便是在这个单位质量分辨的数据中也可以精确的测定质谱峰。表 1 列出了所有 12 个校正离子校正扫描（进样早期获得）和测试扫描（进样后期获得）的计算质量数和 质量偏差。可以看出尽管测试质量偏差在 2.4mDa 之内，校正质量偏差却在 0.5mDa 只内。

Table 1. Calibration Ions from PFTBA Standard and Calibration Mass Errors

Ions	Ion Formula	Exact Monoisotopic Mass (Da)	Calibration Scans #80–131		Test Scans #684–764	
			Calculated Mass (Da)	Mass Error (Da)	Calculated Mass (Da)	Mass Error (Da)
Frag #1	CF ₃ ⁺	68.9952	68.9952	0.0000	68.9943	–0.0009
Frag #2	C ₂ F ₄ ⁺	99.9936	99.9931	–0.0005	99.9922	–0.0014
Frag #3	C ₂ F ₄ N ⁺	113.9967	113.9965	–0.0002	113.9943	–0.0024
Frag #4	C ₂ F ₅ ⁺	118.9920	118.9919	–0.0001	118.9910	–0.0010
Frag #5	C ₃ F ₅ ⁺	130.9920	130.9915	–0.0005	130.9901	–0.0019
Frag #6	C ₃ F ₇ ⁺	168.9888	168.9887	–0.0001	168.9869	–0.0019
Frag #7	C ₄ F ₉ ⁺	218.9856	218.9858	0.0002	218.9847	–0.0009
Frag #8	C ₅ F ₁₀ N ⁺	263.9871	263.9870	–0.0001	263.9852	–0.0019
Frag #9	C ₇ F ₁₄ N ⁺	363.9807	363.9811	0.0004	363.9819	0.0012
Frag #10	C ₈ F ₁₆ N ⁺	413.9775	413.9778	0.0003	413.9761	–0.0014
Frag #11	C ₉ F ₁₈ N ⁺	463.9743	463.9746	0.0003	463.9732	–0.0011
Molecular Ion	C ₉ F ₂₀ N ⁺	501.9711	501.9713	0.0002	501.9699	–0.0012

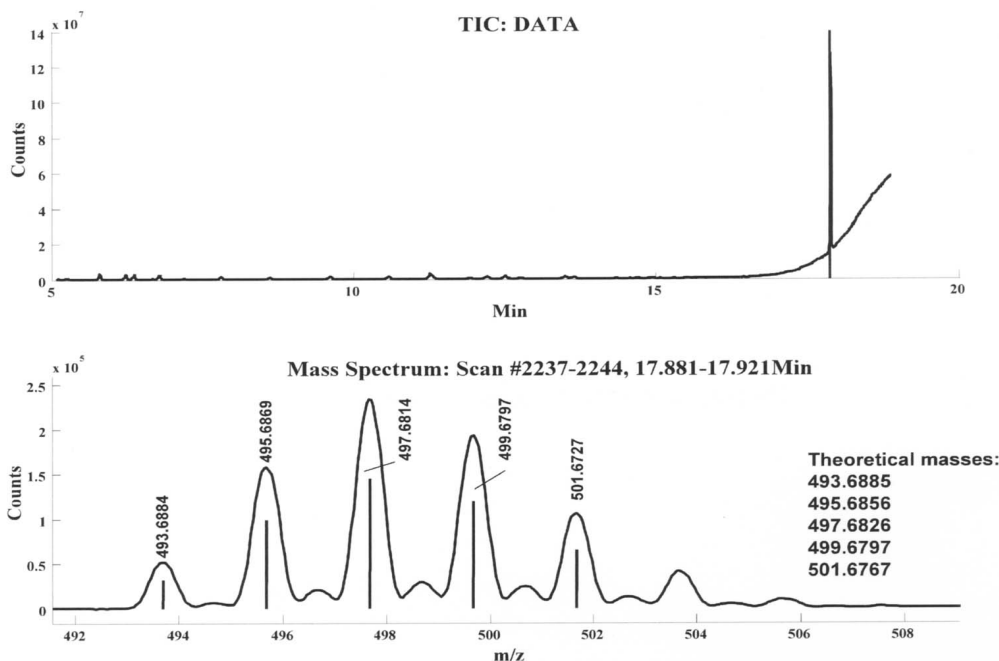


Figure 3. The calibrated mass spectrum for PCB 209 and the accurate masses reported for its five most intense isotopes

尽管表 1 的结果显示了校正离子自己在超过 5 分钟扫描具有很好的质量精度，我们需要将这个校正运用到不同进样的其他质谱扫描这样一个更严格的测试，使它更适宜一个真正的色谱分离过程。杀虫剂混合样品的 GC/MS 分析将会作为一个真正的质谱校正测试，它在真正色谱分离过程中对不同进样和离子的适用性不同于校正离子。图 3 显示了 PCB 209 相应于色谱洗脱的 8 次质谱扫描平均的精确质

量报告。可以看到，报告的精确质量数均与根据它元素组成计算的理论值相差 4 mDa 之内。由于这个分子离子是已知的，而且能够很容易的被确证，所以鉴定它的一些 EI 碎片离子是更有兴趣的。在 424 Da 附近的离子碎片，报告的单一同位素的精确质量为 423.7428 Da，通过设定 C, H, N, O 和 Cl 这几个可能的元素组成进行搜索，结果 $C_{12}C_8^+$ （准确的质量数为 423.7503Da）以 -7.5 mDa 的质量偏差排在候选者中的 17 位。然而当把整个同位素分布引入到 CLIPS 匹配， $C_{12}C_8^+$ 变成匹配最高的候选者，并且这正是这个碎片唯一正确的结构（图 4），尽管质量检测误差稍微大一点。

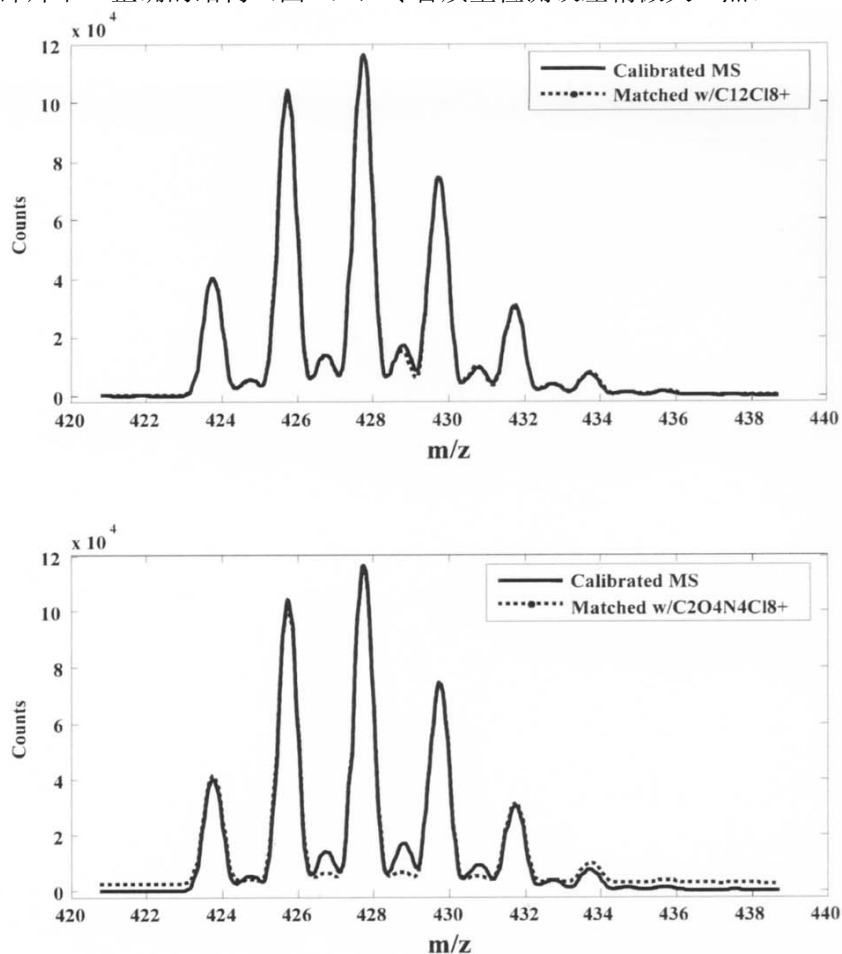


Figure 4. Isotope matching for the 17 th (top) and the 1 st (bottom) hit from the elemental composition search based only on monoisotope masses

图 5 中在 12.52 分钟的一个小的色谱峰在 235Da 附近有一个很强的离子信号，通过 7 次扫描获得的精确单一同位素质量为 235.0057Da。根据这个单一同位素质量设定 C, H, N, O 和 Cl 为可能的元素进行元素组成检索，得到 $C_{13}H_9Cl_2^+$ （准确质量位 235.0081 Da，或质量误差为 -2.4 mDa）排在候选者中的 21 位。后来通过 CLIPS 匹配变为匹配度最好的候选者，这个正好是杀虫剂 p,p'-DDD 的一个著名 EI 碎片的位置正确结构。

为了演示这个精测质量方法在未知化合物鉴定方面的应用，在精测质量之前对图 5 中 GC/MS 进样最后 TIC 上升部分进行平均，以便帮助鉴定可能的 GC 色谱柱流失。图 6（上）是 TIC 信号上升部分相关的平均质谱图。通过精确质量鉴定，结合 CLIPS，在设定 C, H, N, O 和 Si 为可能元素时检索得

到了几个可能的元素组成候选者和他们的理论同位素图，如图 6（下）。这些可能的候选者能通过柱化学知识进一步优化以提高对柱流失的理解。

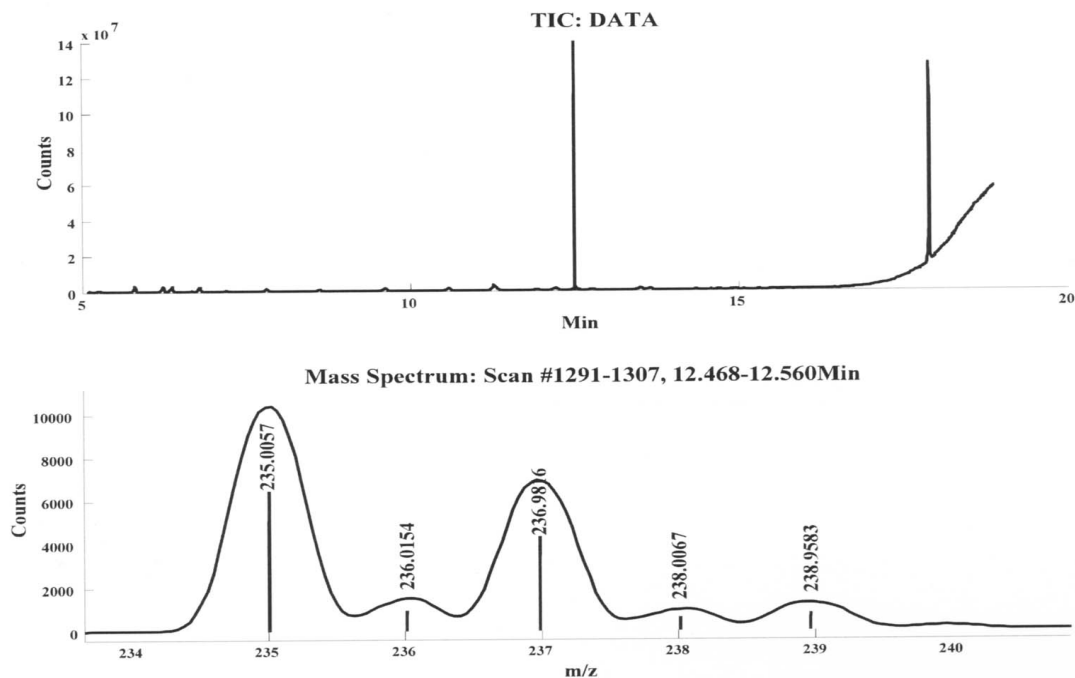


Figure 5. The accurate mass measurement for an EI fragment of pesticide p,p'-DDD

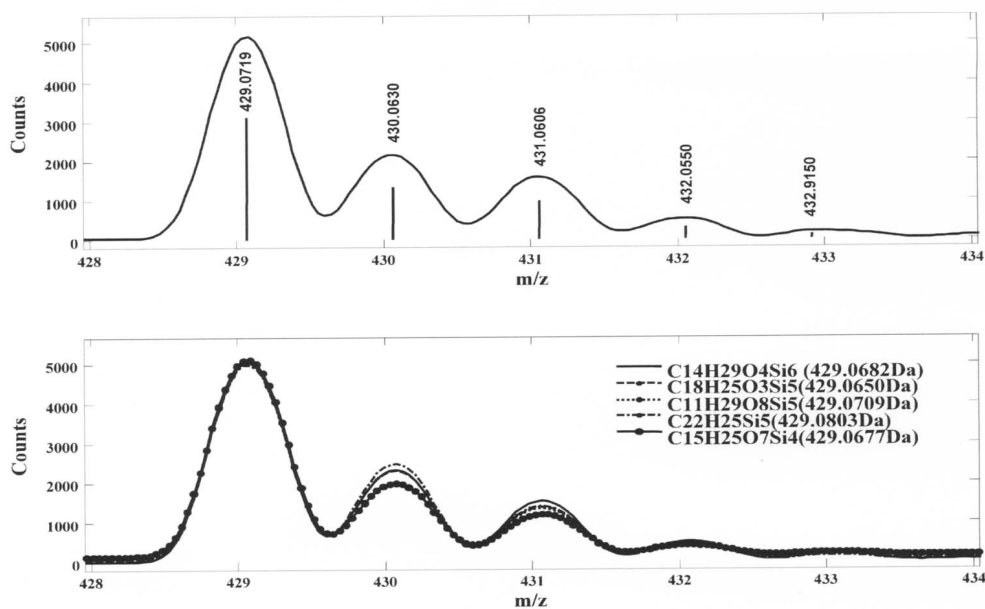


Figure 6. The ion isotope pattern related to the rise in total ion signal towards the end of a GC/MS run (top) and the theoretically calculated isotope patterns of five possible candidate ions (bottom)

结论

这篇应用实例展示了在单位质量分辨的单四极杆 GC/MS 系统上通过全面和精心设计的质谱校正，包括质量轴和峰形校正可获得高质量精度的能力。校正可方便的使用仪器自带的校正标样，通过注

入测量法并应用于实际在线色谱分离的 GC/MS 进样过程。质量偏差因这种外部校正可控制在几个 mDa。这种包括峰形校正的全面校正与 CLIPS 相结合能够大大的提高在 GC/MS 实验中未知化合物结构的元素组成鉴定能力。

参考文献

1. Blom, K. F. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 715.
2. Tyler, A. et al *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3561.
3. Kind, T. *BMC Bioinformatics* **2006**, 7, 234.
4. Gu M, Wang Y, Kuehl D. *Spectroscopy*, May, **2005**.
5. Gu M, Wang Y, Zhao X, Gu Z, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 764–770.
6. Wang Y and Prest H, *Chromatograph (Japan)*, submitted, December, 2006.
7. http://www.cernobioscience.com/resources/CLIPS/CLIPS_Product_Preview.pdf

单四极杆 GC-MS 系统进行分子式测定的校正稳定性

顾鸣、王永东

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

——发表于 *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 ± 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^[1]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，设计了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^[2, 3]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^[4]，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，或在不经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（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（原始数据模式或叫做轮廓模式）、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。

结果和讨论

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。

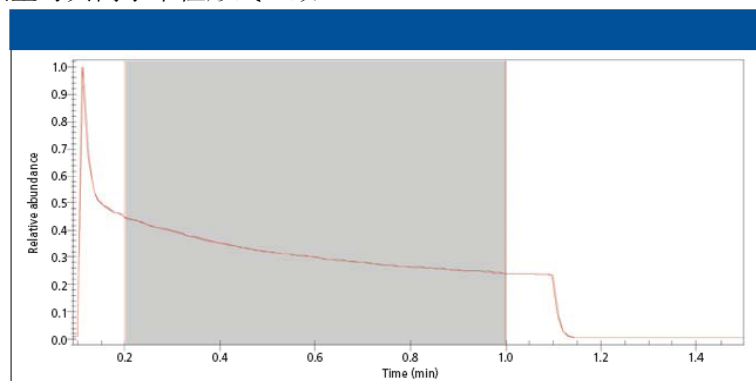


图 1. 第一次 PFTBA 校正气运行的总离子流图

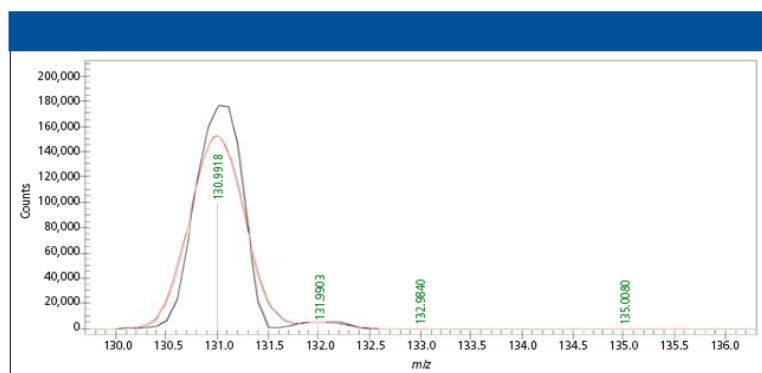


图 2. PFTBA 校正离子 (C_3F_5^+) 校正前 (黑) 后 (红) 的质谱数据

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_3F_5	130.9920	130.9989	6.9	52.7
C_3F_7	168.9888	168.9980	9.2	54.4
C_4F_9	218.9856	218.9931	7.5	34.2
$\text{C}_5\text{F}_{10}\text{N}$	263.9871	263.9929	5.8	22.0
$\text{C}_7\text{F}_{14}\text{N}$	363.9807	363.9889	8.2	22.5
$\text{C}_8\text{F}_{16}\text{N}$	413.9775	413.9849	7.4	17.9
$\text{C}_9\text{F}_{18}\text{N}$	463.9743	463.9806	6.3	13.6
$\text{C}_9\text{F}_{20}\text{N}$	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, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$) 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^[9]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）。

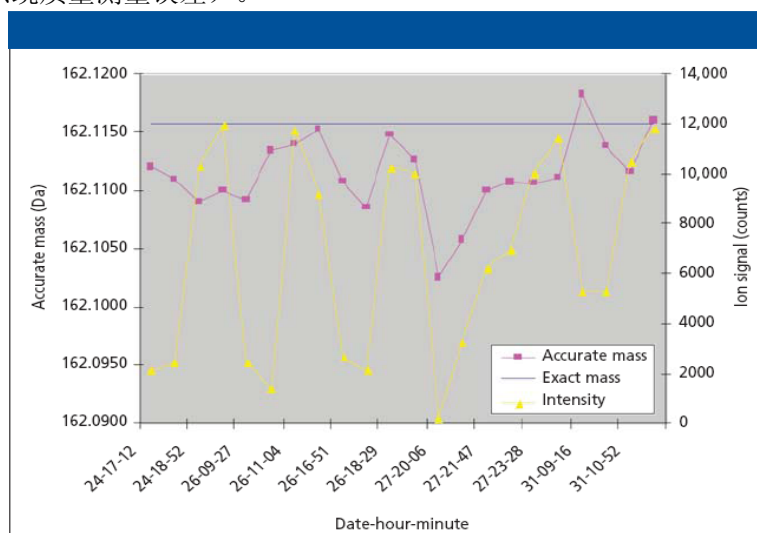


图3. 报告的质量准确度、单同位素峰离子强度和已知 m/z 162 Da 的真实质量数

正如文献^[9]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。

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。

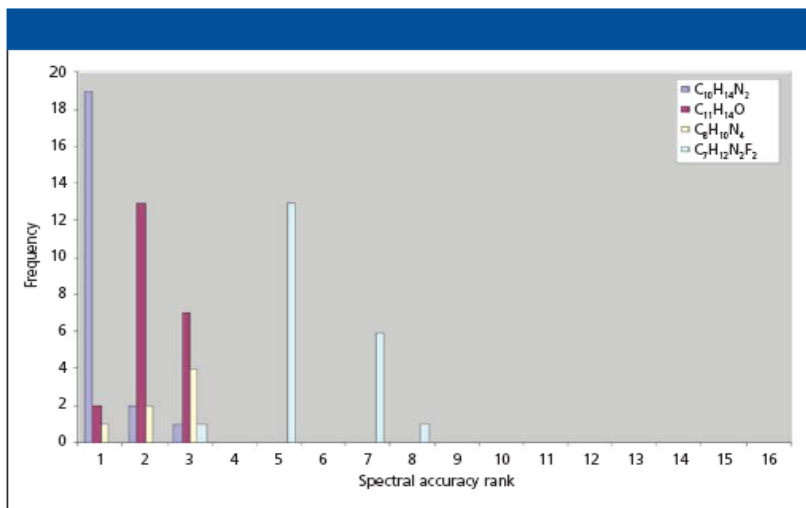


图 4. m/z 162（烟碱，分子式 $C_{10}H_{14}N_2$ ，真实质量为 162.1157 Da）离子识别

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。

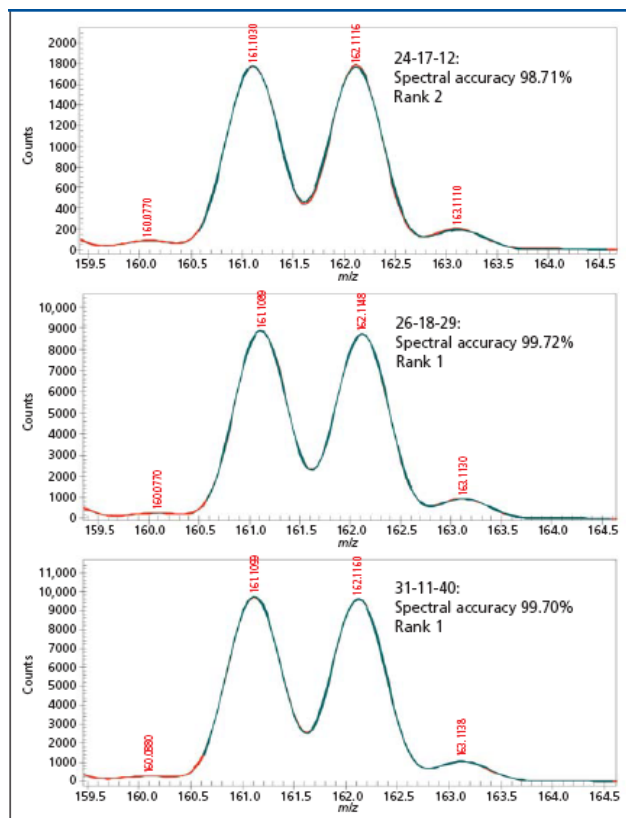


图 5. 校正质谱图（红色）与 $C_{10}H_{14}N_2$ 理论质谱图（青色）的叠加图
（上部为第一天实验、中间为两天后实验、底部为一周后实验数据）

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).
- (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>

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。

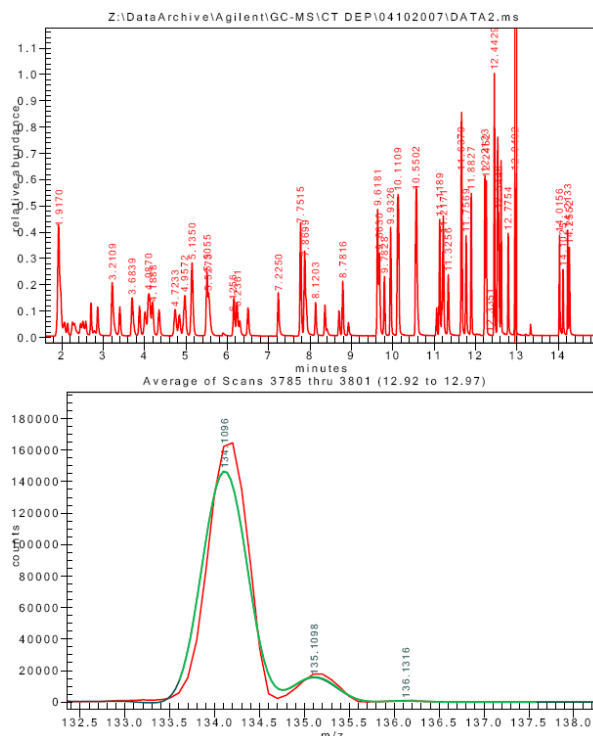


图 1. 顶图显示 73 种目标 EPA 化合物的总离子流图。底图显示 n-丁苯未校正（红色）和校正后及理论（绿和黑色）谱图的匹配结果，99.85% 的谱图准确度匹配几乎完全重叠

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：

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

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 ₂ Cl ₂ (² H) ₃	65.0112	0.1	0.8
Fragment Chlorobenzene-d5	C ₆ (² H) ₅	82.07	-0.5	-6.7
Fragment 4-Bromofluorobenzene	C ₆ H ₄ F	95.0297	-0.5	-5.4
Fragment 1,4-Dichlorobenzene-d4	C ₆ (² H) ₄ Cl ₂	115.0253	-0.7	-5.8
1,4-Dichlorobenzene-d4	C ₆ (² H) ₄ Cl ₂	149.9941	0.2	1.5
Dibromofluoromethane	C ₂ HBr ₂ F	189.8429	1	5.3

注：氘用(²H)表示

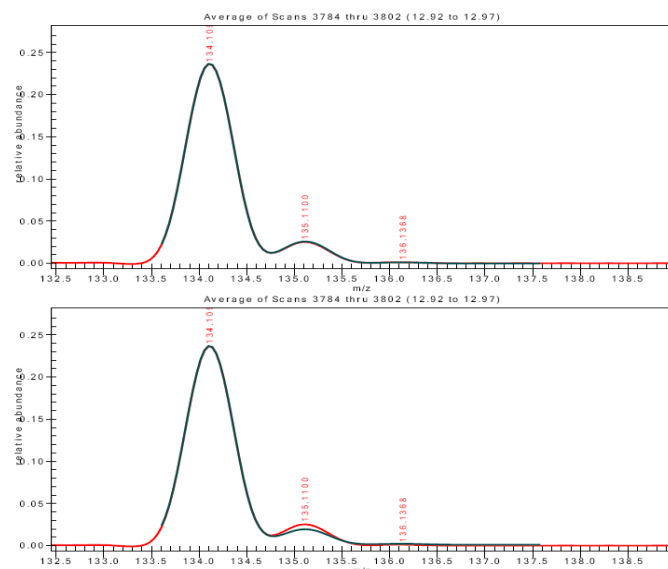


图2. CLIPS检索后n-丁苯谱图匹配结果。顶部显示谱图准确度为99.85%排名第一的校正谱图（红色）与理论谱图（黑色）的叠加图；底部显示谱图准确度为97.53%排名第二（C₇H₁₆OF）匹配图

表2. 94种目标VOCs中的部分化合物

Compound	CAS #	Formula	Mass (Da)
Toluene	108-88-3	C ₇ H ₈	92.0626
(trans)-1,3-Dichloropropene	10061-02-6	C ₃ H ₄ Cl ₂	109.969
1,1,2-Trichloroethane	79-00-5	C ₂ H ₃ Cl ₃	131.93
Tetrachloroethene	127-18-4	C ₂ Cl ₄	163.8754
1,3-Dichloropropane	142-28-9	C ₃ H ₆ Cl ₂	110.9768
Dibromochloromethane	124-48-1	CHClBr ₂	205.8134
1,2-Dibromoethane	106-93-4	C ₂ H ₄ Br ₂	185.868
Chlorobenzene	108-90-7	C ₆ H ₅ Cl	112.008
1,1,1,2-Tetrachloroethane	630-20-6	C ₂ H ₂ Cl ₄	165.8911
Ethylbenzene	100-41-4	C ₈ H ₁₀	106.0783
m-Xylene + p-Xylene	108-38-3	C ₈ H ₁₀	106.0783
o-Xylene	95-47-6	C ₈ H ₁₀	106.0783
Styrene	100-42-5	C ₈ H ₈	104.0626
Bromoform	75-25-2	CHBr ₃	249.7628
iso-Propylbenzene	98-82-8	C ₉ H 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 (C₈H₈, 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。

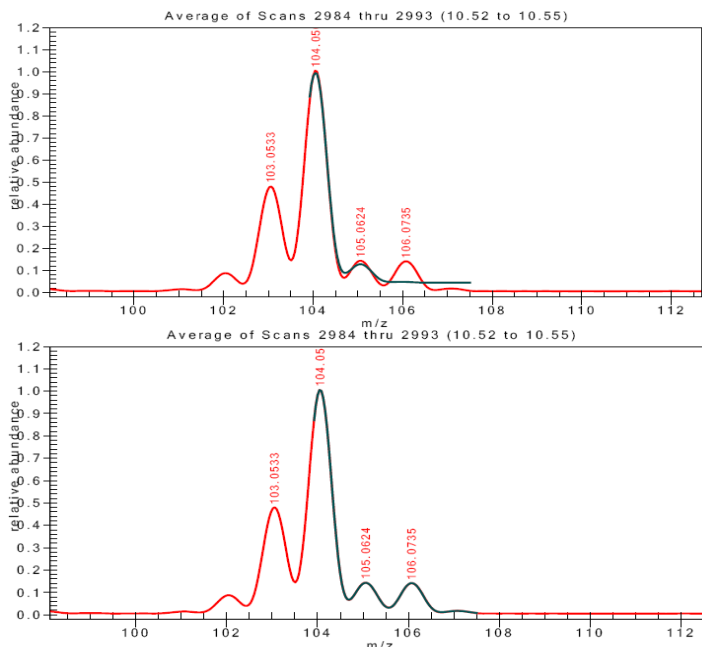


图 3. 顶图显示 m/z 104 苯乙烯离子 (C_8H_8 , 红色) 与其理论谱图 (黑色) 叠加图, 匹配结果很差, 暗示有干扰离子存在。底图 为包含了二甲苯 (C_8H_{10}) 和脱氢的二甲苯的匹配图, 混合物匹配的谱图准确度为 99.75%, 确认存在二甲苯干扰。

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	$C_8H_7N_2F$	114.0593	-1.1264	-9.876	97.9173	3
4	$C_8H_8NO_2$	114.0555	2.6965	23.6414	97.8515	2.5
5	$C_8H_{10}S$	114.0503	7.879	69.0787	97.7656	2
6	$C_4H_8N_3O$	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	$C_3H_8N_2$	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_6O_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, 提供待测化合物的精确质量数和分子式, 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

- [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] EPA METHOD 8260B VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (GC/MS) (see www.epa.gov)
- [3] Manufacturers published specification for the Waters GCT Premier. Waters Corporation, Milford, MA.
- [4] Kind, T. et al “Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: Mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm”, BMC Bioinformatics 2006, 7, 234 (www.biomedcentral.com/1471-2105/7/234).
- [5] S.E. Stein and D.R. Scott, “Optimization and testing of mass spectral search algorithms for compound identification”, J. Am. Soc. Mass Spectrom 5 (1994), pp. 859–866.

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^[1], 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^[2]或双喷雾^[3], 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^[4]。

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^[5-6]。

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, 而这与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, 特别是在化合物含有 Br、Cl 或 S 等有显著同位素特征元素时^[5]。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^[7-9], 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
2. 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
3. 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。

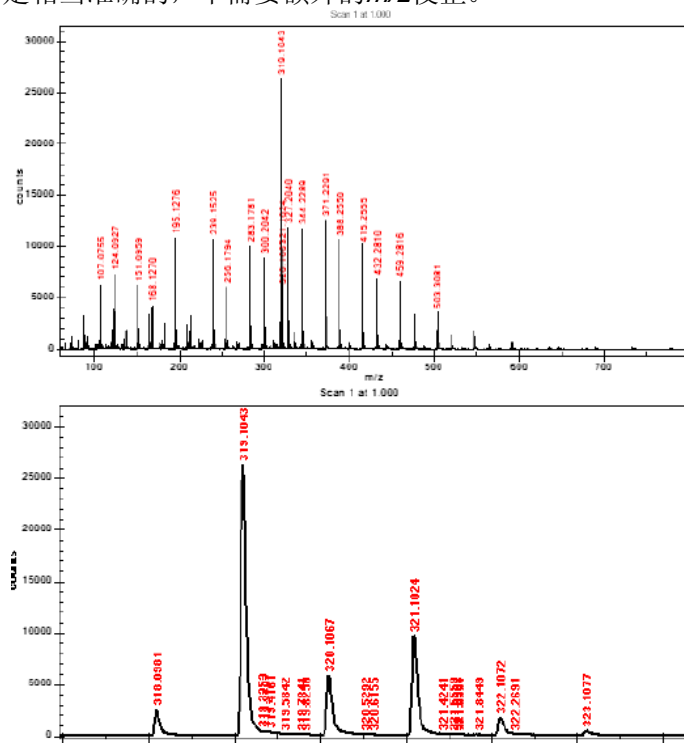


图 1. 一个平均的 AccuTOF DART MS 谱图（顶图 – 完全的 MS 谱图；底图 – 319 Da 未知离子的谱图部分）

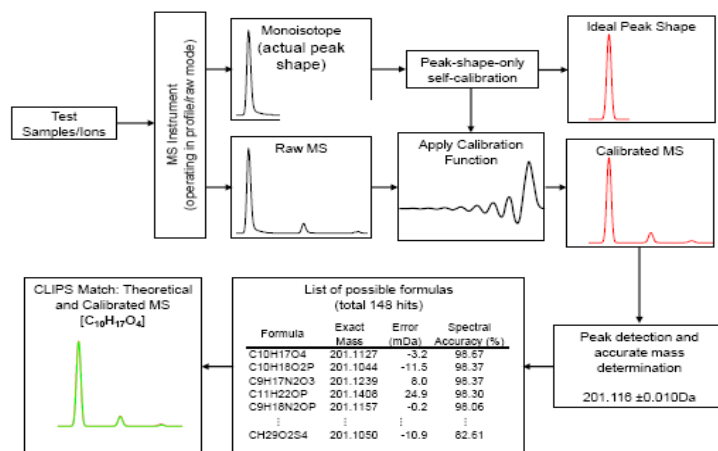


图 2. 高分辨 MS 系统用于分子式测定的 MassWorks sCLIPS 通常数据处理流程

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%。

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

这里， \mathbf{e} 是符合残余向量， \mathbf{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。

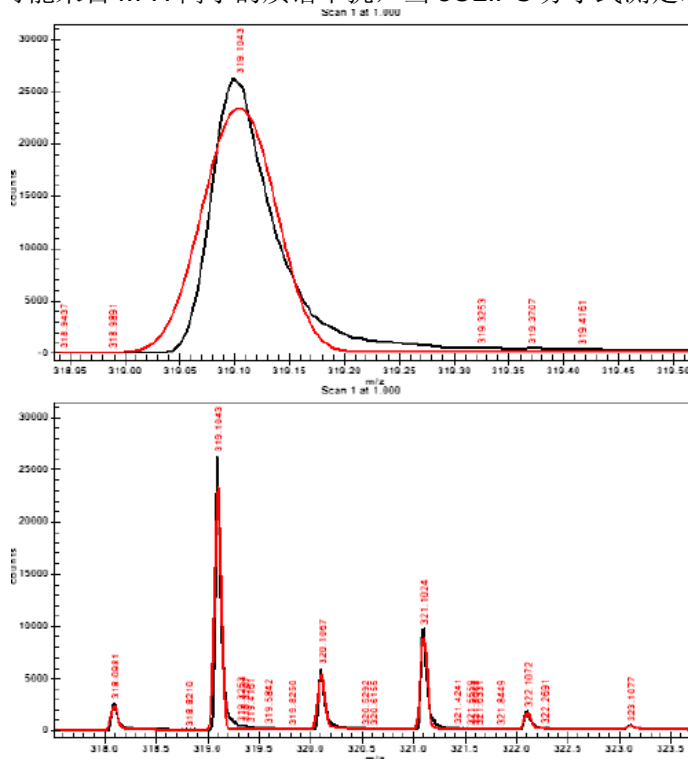


图 3. 感兴趣离子的原始（黑色）和峰形校正后（红色）质谱图（顶图 — 单同位素峰；底图 — 包含可能 M-H 离子的完全同位素轮廓）

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 ± 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得到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

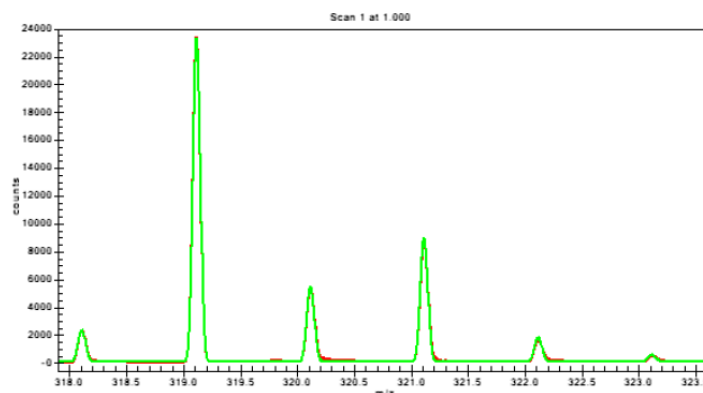


图4. 谱图准确度为97.27%排在第一位的分子式（ $C_{17}H_{20}N_2SCI$ ）的理论质谱图（绿色）与校正谱图（红色）的叠加

图 5 显示了校正后谱图与排名第二分子式（ $C_{15}H_{24}O_3SCI$ ）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。

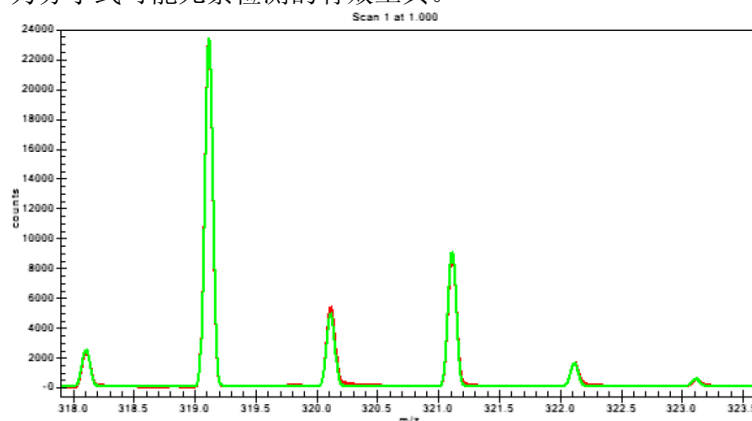


图 5. 谱图准确度为 96.52%排名第二的分子式（ $C_{15}H_{24}O_3SCI$ ，无氮元素）的理论谱图（绿色）与校正谱图（红色）叠加图

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。

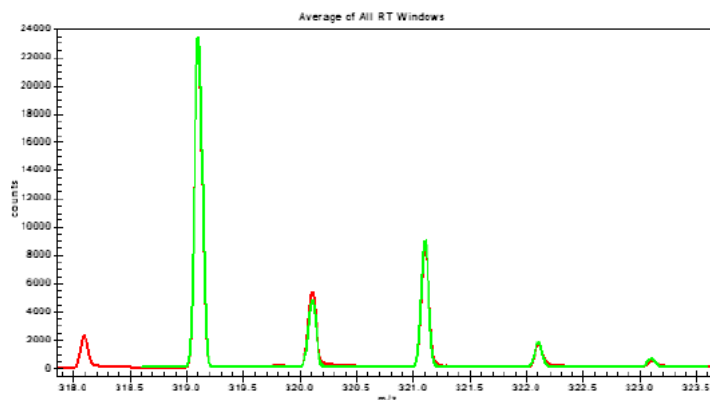


图 6. 没有考虑 **M-H** 离子的谱图准确度为 **96.36%** 排名第一的分子式 (**C₁₇H₂₀N₂SCI**) 的理论谱图 (绿色) 与校正后谱图 (红色) 的叠加

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
3. Edgar Naegel, 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,
12. http://www.cernobioscience.com/resources/ApplicationNotes/Agilent_LC-MS_Single_Quad_Infusion.pdf

精确质量离子过滤在单分辨液质中用于代谢物的鉴定

Xian-guo Zhao and Zhe-ming Gu

(XenoBiotic Laboratories, 107 Morgan Lane, Plainsboro, NJ 08536, USA)

——发表于 *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006;20

由于用于处理数据的时间远多于采集数据所花的时间，因此用快速液相色谱/质谱联进行代谢物的鉴定严重依赖于数据的有效处理。如何快速准确的从复杂的LC/MS数据中鉴定出代谢物峰是加速数据分析的关键步骤。目前，选择离子是减少基质效应干扰的常用方法。本文介绍了一种新的自动提取离子以获得代谢相关产物的新方法，该方法可用于在单分辨LC/MS上分析复杂生物基质中的代谢物。本文以该方法在LC/MS分析异搏定药物在添加了胆汁后的大鼠微粒孵育系统反应后的产物中的应用为例，对方法进行了介绍。在单分辨三重四级杆质谱上采集轮廓图后，用独特的程序外标法对质量轴和峰形进行校正，以获得高精度的质量数用于代谢物的鉴定。用常规提取离子方法后，母体药物（*m/z* 455）、脱甲基产物（*m/z* 441）、脱烷基产物（*m/z* 291）中仍然含有大量的假阳性峰；通过精确质量数和同位素峰形双重过滤后，可以有效地去除假阳性峰，获得干净的代谢物的峰。用该方法处理得到的色谱图与用放射性内标标记后用放射性检测器检测后获得的结果一致。

从复杂的生物材料（如尿液，血浆，胆汁，粪便）进行药物代谢物的分析鉴定，对生物学家来说是一件具有挑战性的工作。用LC/MS分析这些代谢物时，常常由于基质中大量的内生离子掩盖了目标物，使我们很难在总离子图中观察到代谢物的峰。目前，已经有一系列的方法用于在数据获得或数据处理过程中去除这些背景干扰。如用固相萃取法和液液萃取法在进样前对样品进行净化，尽管这些方法比较简单且使用起来比较方便，但在净化的过程中很容易损失部分代谢物，尤其是当母体化合物的浓度比较低的情况下。此外，一些方法采用三重四级杆串联质谱的中性丢失扫描（NL）或母离子扫描模式（PI）选择性监测特定的代谢物离子。例如，用NL扫描质量数176 Da离子，检测带有葡萄糖酸苷的药物中的葡萄糖酸苷活性基团。NL和PI扫描具有极强的基质过滤作用，可以从复杂的基质监测目标代谢物，并形成干净的质谱图。但这种方法首先需要知道目标物的特征碎片，且方法不具有通用性。此外，串联质谱在进行NL或PI扫描时，丰度较低的代谢产物在四级杆中进行碰撞分裂时，目标代谢物往往不能产生足够检测需要的浓度。

基质干扰也可以通过一些数据处理的方法进行去除。从复杂基质中寻找代谢物最常见的方法就是选择离子提取（XIC），该方法处理后，比起总离子流图可以选择性的进行目标物检测，但当样品基质较复杂时，如胆汁和粪便，往往会带来大量的假阳性。基于母体药物和其代谢物具有相似的离子丢失、离子丢失过滤，放射性检测可以很好的过滤基质离子，产生痕量代谢物的轮廓图。目前，只有高分辨质谱，如四级杆串联飞行时间质谱（qTOF）或傅立叶变换质谱（FTMS），可以对离子进行很好的分离且可获得高精度质量数，才能通过数据处理去除大量的基质干扰离子。该方法的过滤作用依赖于基质离子峰或其同位素是否与药物离子具有相似的离子丢失。有些有经验的用户有时也通过同位素峰形鉴定含氯或含溴的代谢物，但该方法也就仅仅用于部分含氯或含溴的代谢物。

Earlier 经验方程给出了精确质量的关系式：

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

R表示质谱分辨率，S表示离子信号强度；该关系式假设只有离子才含有噪声。通过内标校正，一个质量不确定度为10mDa的离子，用高分辨质谱（半峰宽=0.1Da）进行选择离子检测。显然，选择离子可以获得高的信号值，尤其是相对高的质量精度。当我们在一个既能采用高分辨模式又能采用低分辨模式的质谱系统中比较质量不确定度时，尽管分辨率为5000的高分辨质谱比分辨率为1000的低分辨质谱分辨率高5倍，但低分辨质谱可以部分或完全由其高的信号得到补偿。因此，在低分辨率质谱上，无论是采用蠕动泵进样还是色谱进样，也可以得到质量误差为几个 mDa或 5ppm 的精确质量。另一方面，目前的质谱软件在对数据进行处理时，仍有大量的信息没有得到充分挖掘。一组完整的同位素轮廓图包含代谢物全部的同位素峰，即使是在单分辨率质谱上，仍能提供大量的信息已区分真正的代谢物和基质离子。

本文介绍了一种新的通过精确质量数质谱轮廓图过滤，对用单分辨三重四级杆获得 LC/MS数据进行处理，从复杂的基质中提取与代谢物相关信息的提取离子方法。数据来自于基质信号较强胆汁样品中异搏定药物代谢物分析，该方法可以去除复杂的背景，产生只含目标物不含假阳性峰的简单离子色谱图。

实验 试剂

色谱纯水、色谱纯乙腈购自EM公司；异搏定、红霉素、异丙嗪、利舍平、色氨酸三肽、特非定、丁螺环酮、洛派胺、氯化氢、磷酸二氢钾、氯化镁、NADPH酶购自Sigma公司。生化级醋酸胺购自Fluka公司，雄性SD大鼠肝微粒体购自XenoTech公司。

仪器

岛津HPLC系统，LC-10ADvp泵，SIL-HTA自动进样器，C18 HPLC色谱柱（C18 150×4.6 mm,3μm）。流动相 A相为0.4%的甲酸溶液，B相为乙腈。B相从0分钟开始到68分钟，比例从0%上升到50%。HPLC馏分经转换阀直接注入质谱离子源。API 4000 Q TRAP质谱仪用于质谱检测。轮廓图模式采集数据。采用正离子电喷雾、一级四级杆扫描 100-800 m/z。离子喷雾电压 5000 V，喷雾气温度 500 度，反压气 20 psi, declustering 电压 50 V，entrance 电压 20 V。

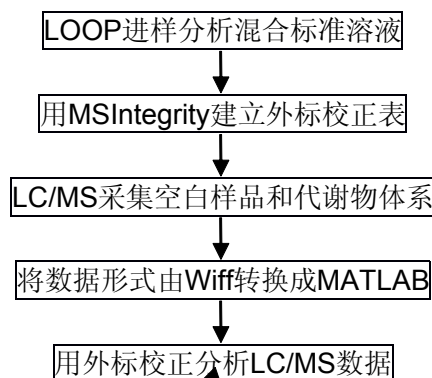
样品制备

反应体系包括 0.1 M 磷酸缓冲溶液（Ph 7.4），10 uM 底物，4mM 氯化镁，大鼠肝微粒体（1 mg/ml 微粒体蛋白）和 1mM NADPH。先将异搏定在37 °C预热5分钟，然后在体系中加入NADPH启动反应。一小时后，取出1mL反应液，用2 mL冰乙腈灭活反应。在4 °C条件下，14 000 rpm 离心10分钟去除微粒体蛋白。上层液体在室温下，用氮吹浓缩近干，用250 uL 50% 甲醇水溶液溶解。用整数倍的SD大鼠胆汁或粪便稀释异搏定反应产物，以模拟实际代谢样品。

用1: 1的乙腈水溶液（含0.1%的甲酸）稀释红霉素、异丙嗪、利舍平、色氨酸三肽、特非定、丁螺环酮、洛派胺标准混合液。

数据采集和分析

数据采集和处理过程概括如流程图1。采用LOOP进样分析标准混合溶液，A,B流动相的比例为1: 1,流速为0.7 mL/min,质谱分析条件与LC/MS分析异搏定代谢物方法一致。采集完标准物质数据后，用LC/MS分析以下样品：空白、异搏定代谢物体系、含大鼠胆汁或粪便的代谢物体系。



流程图1. 用 Q TRAP四级杆系统采集和处理LC/MS数据流程

用Analyst script(Wiff to Matlab) 将由Q TRAP 采集的数据转换成MATLAB格式 (MathWorks,Natick,MA,USA)。用MassWorks软件 (美国思路生科公司) 处理转换后的数据。MassWorks软件具有以下三重功能：谱图校正、精确质量数和同位素轮廓过滤、通过精确质量数确定物质元素组成。基于质谱的特点及其稳定性，既可以采用外标法，也可以内标法，还可以采用内标法和外标法相结合的方法。实验中，混合校正标样的轮廓模式质谱图用于建立外标校正法，可以分别用于后面LC/MS采集的所有数据。校正完后，以质量误差小于10 mD，谱图精度误差不大于15%，用MassWorks软件对数据进行提取。经过提取后剩下的代谢物色谱图称为精确质量轮廓提取离子图，最后再通过精确质量测定进行确证。

结果与讨论

异搏定是一种钙通道阻滞剂，广泛用于心脏病和冠状动脉疾病。异搏定体系广泛用于大鼠和人肝微粒体代谢研究，并已得到一些代谢物。主要代谢物为从4个甲氧基位点和1个氮甲基位点上脱去一个甲基的脱甲基代谢物，见图2中异搏定的结构式。目前，异搏定已成为不同LC/MS系统进行代谢物鉴定的模式系统。本文，以该特征代谢为例，详细介绍了MassWorks这种进行代谢物鉴定的新方法。

质谱校正

精确质量鉴定作为一种定性鉴定的工具，越来越广泛的用于代谢物结构鉴定，而目前由于质谱校正和峰形计算技术的局限性，使四级杆质谱不能得到精确质量数，而影响了这一功能的发挥。MassWorks的出现，使得在单分辨质谱上可以获得精确质量数。

要在低分辨率质谱上实现高精确质量数测定，必须充分利用质谱峰信息，并不其进行全面的校正。传统四级杆仪器MS校正一般只关注质量误差，而不关心基线、同位素干涉、噪声过滤和峰形补偿。由于不考虑这些因素，因此其质心计算方法的可靠性就相对较差，最终导致当离子峰宽 (FWHM) 在0.7 Da左右时，得到b的质量精度就较差。MassWorks作为一种新的校正方法，在进行校正时即进行了质量轴校正，又进行了峰形校正，同时考虑噪声过滤。

图1 描述了外标校正的过程和结果。标准物质为6种常见的小分子药物，其MH⁺的m/z分别为152.071、285.143、386.256、472.322、609.281和716.459，其原始质谱图见图1 (a)。按HAMSCA程序建立混合标样的校正表。如图1 (a)，用外标对质量轴校正和峰形补偿后，很小的一个峰，其信噪比得到极大的提高 (S/N, 图1.b)。混合标准溶液质量

校正误差均小于1mD(图1c)。需要说明的是,图1c中显示的标准物质质量误差只是用来评价校正表建立的好坏,只有当用外标校正由LC/MS采集的样品质谱图时,校正后得到的精确质量与其理论值的差值,才是真正的测量误差。混合标样建立的校正的质量数范围为156-716,可以满足异搏定及其全部代谢物的精确质量数测定,测定结果见表1。尽管混标数据的采集与代谢物样品数据的采集相差6个小时,只要仪器的稳定性较好,外标校正仍能获得很好的实验结果,所有代谢物的测定结果与理论值得误差均小于11 mD。在进行精确质量数测定时,用外标校正比起内标校正,具有以下优势:第一、只要在质量范围内,外标在校正不同样品时可以重复利用;第二、外标不会引入外部离子的抑制和干扰作用。最重要的是,外标法不需要双ESI喷雾或柱后蠕动泵注射,极大地简化实验过程。

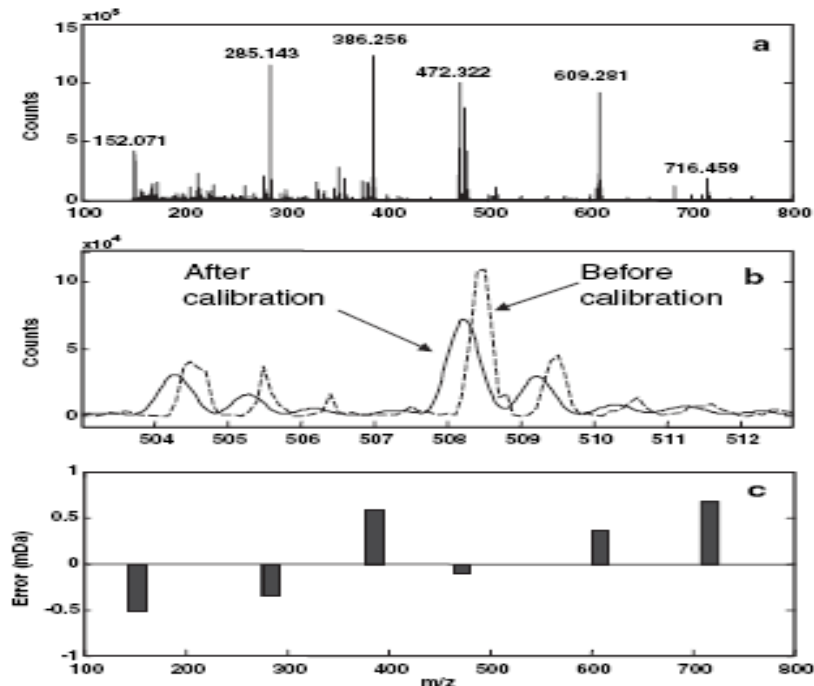


图1 (a) 标样质谱图; (b) 校正前和校正后一小峰的放大图; (c) 标准物质的质量误差

表1 异搏定代谢物的精确质量数测定

Metabolites	Exact mass (Da)	Verapamil in bile, external calibrated		
		Retention time (min)	Measured mass (Da)	Mass errors (mDa)
Parent drug	455.291	33.200	455.285	-5.600
Demethylated	441.275	28.700	441.282	6.500
Demethylated	441.275	29.500	441.276	1.100
Demethylated	441.275	31.200	441.281	5.800
Demethylated	441.275	32.200	441.282	6.300
Demethylated	441.275	32.800	441.283	7.500
Dealkylated	291.207	26.500	291.203	-4.800
		Standard mass errors (mDa)		
		Verapamil in urine, external calibrated		
Parent drug	455.291	31.200	455.294	3.000
Demethylated	441.275	27.800	441.268	-7.700
Demethylated	441.275	28.100	441.284	9.000
Demethylated	441.275	28.900	441.286	11.100
Demethylated	441.275	29.200	441.277	2.100
Demethylated	441.275	30.500	441.286	11.100
Dealkylated	291.207	22.900	291.211	4.100
		Standard mass errors (mDa)		
				7.700

精确质量及轮廓提取离子色谱图 (AMPXIC)

随着质谱技术的不断发展,LC/MS在高通量分析工作中自动化程度越来越高,但由于缺乏有效的数据分析工具,使数据处理成为整个分析过程的瓶颈。尤其是,当我们用LC/MS分析实际样品中的代谢物时,目标物常常会因被大量的背景离子掩盖,而在TIC图

中很难被发现，要鉴定这些代谢物，就成了一项非常耗时和令人疲劳的工作。而我们采用精确质量及轮廓提取处理可以自动进行，并极大的过滤基质干扰，获得的AMPXIC图比传统的选择离子法具有更高的选择性。同位素模拟处理方法只能用于含氯或含溴的化合物，AMPXIC法可以用于代谢物结构鉴定中所有类型元素组成的化合物，而不管该物质是否含氯或溴。

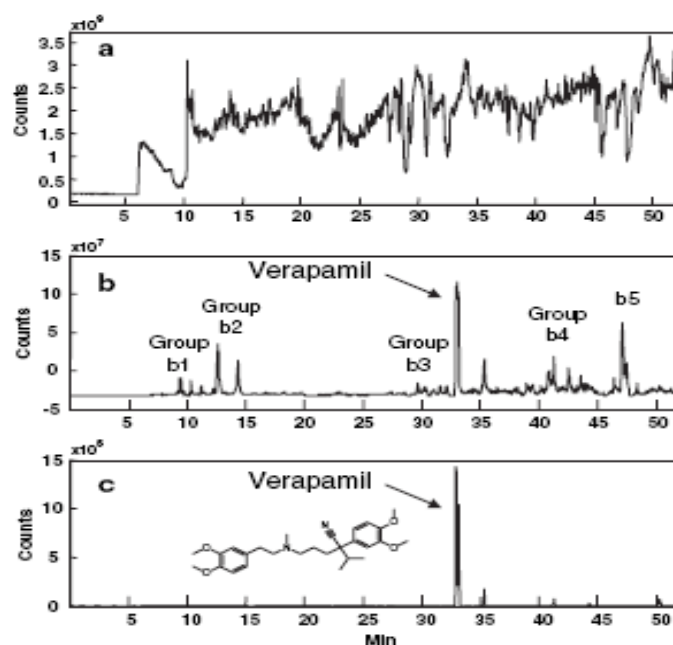


图2 (a) 基质添加异搏定代谢物体系总离子图(TIC);(b) 胆汁中添加异搏定体系 m/z 454.8-455.8选择离子图(XIC); (c) 胆汁中添加异搏定体系AMPXIC图

用AMPXIC法处理用LC/MS分析得到的大鼠胆汁添加异搏定代谢体系的样品数据，可以极大的去除严重干扰目标物的基质离子。图2a是经LC/MS分析得到的总离子图（TIC），很显然我们很能从TIC中直接得到一些有用信息，图2b是以0.5 Da为窗口大小（ m/z 454.8-455.8）获得的选则离子色谱图（XIC），其中包含了33min时的异搏定母体离子（ m/z 455.291）。从XIC图中，我们看到仍有大量的假阳性离子，选择性不足。由于在单分辨质谱不能得到精确质量数，且未能运用同位素轮廓过滤，所以XIC提取离子的能力有限。当我们用该信方法处理同一数据时，几乎可以去除全部的假阳性离子，得到远比XIC干净的AMPXIC图（图2 c）。该方法选择性的极大提高首先得益于精确质量数的测定。如保留时间为13、14.5min的两个物质，由于其质量数分别为455.164和455.166，与异搏定 MH^+ 离子455.291的质量数相差120mDa以上，而被过滤去除。图2b中b1、b3、b4三个小峰也因其质量数与目标物的质量数相差较大而被过滤到。类似的，图3中，通过AMPXIC处理，异搏定的五个脱甲基和一个脱羟基代谢物可以很干净的从TIC图中提取出。得益于精确质量提取和同位素过滤，XIC图中的大量干扰物得到极大的去除。如图3a,保留时间为15.6和17.3min的两个离子的 m/z 分别为441.198和441.196，因其质量数相差较大而被过滤。

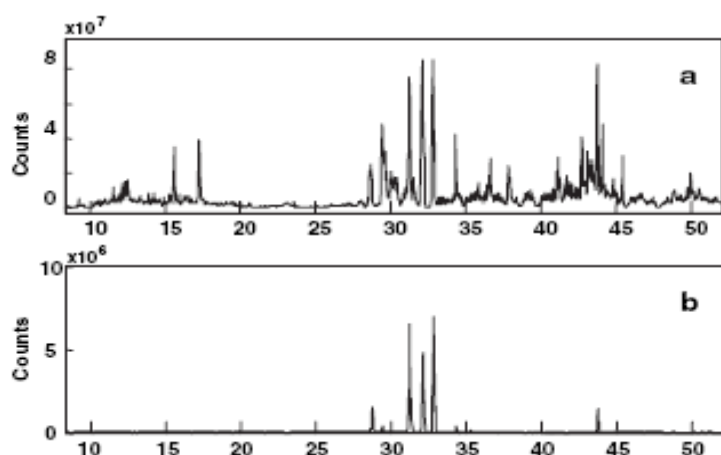


图3 (a) m/z 数为440.8-441.8 基质添加代谢体系XIC

图(b) 基质添加代谢体系异搏定脱甲基AMPXIC图

图4b 异搏定母体药物LC分析色谱图，由于不同时间点测量得到的质量数精度不同，AMPXIC图表现为两个峰，进一步说明了精确质量数过滤的作用。当目标物从色谱柱中流出时，进入质谱仪检测器，峰信号开始，然后由于样品饱和出平头峰，最后信号下降。众所周知，当样品饱和时，测定的质量精度会比较差。由于在信号上升和下降两阶段，浓度适当，测得的质量精度较好，为455.287和455.296，最后AMPXIC表现为两个独立的峰，而当样品的浓度饱和时，测得的质量为455.384，比起理论值455.291小了100mDa,因此在饱和位置时的峰被过滤掉，最后导致一个物质的 MH^+ 表现为两个独立的峰。

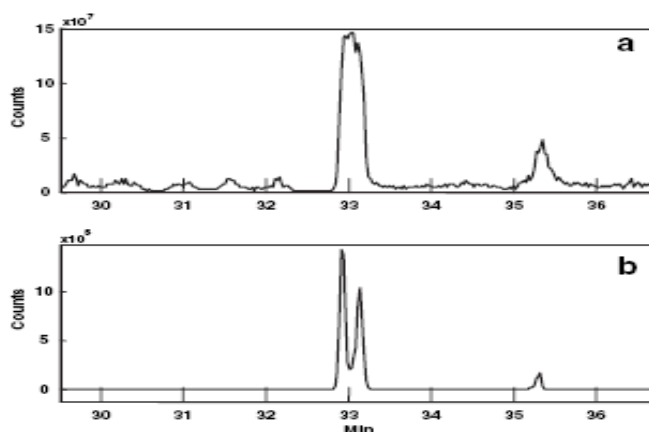


图4 (a) 基质添加过饱和和异搏定代谢体系 m/z 454.8-455.8 Da选择离子色谱图 (XIC)

(b) 基质添加过饱和和异搏定代谢体系母体药物AMPIC图

其次，同位素轮廓过滤在假阳性峰的过滤中也发挥着重要作用，图2 b中47.2min的峰去除就对这一功能的解释。尽管这个峰出的比异搏定母体晚很多，从理论上讲不可能是来自异搏定的代谢物，由于这个峰有一个合理的精确质量数而不能通过精确质量过滤去除，因此可以用它来说明同位素轮廓过滤的作用。比较XIC图与AMPXIC图在45至50分钟的色谱图，有着很大的差别，在XICT图中47.2min峰是整个图中丰度第二强的峰，而在AMPXIC中确没有这个峰。该峰的精确质量数为455.300（图5a），比异搏定母体药物 MH^+ 的 m/z （455.291）仅仅小10 mD. 但我们比较被过滤掉的峰的质谱图（图5a）与母体药物峰的质谱图9(图5b),455.300峰仅是 MH^+ 454.297峰一个 ^{13}C 同位素峰，由于其同位素轮廓与母体药物同位素轮廓相差较大，因此被过滤掉。换句话说，AMPXIC中剩余的峰既要符合精确质量数要求，同时其同位素轮廓又必须与母体目标物一致。

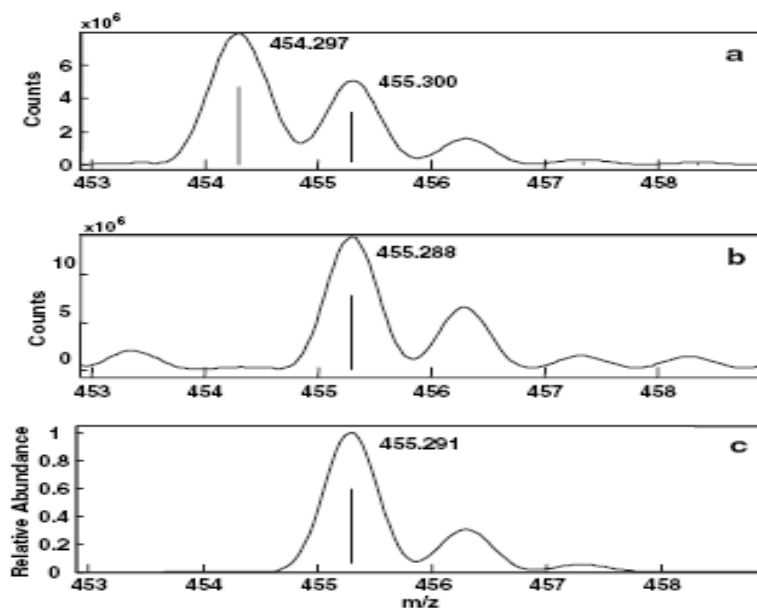


图5 (a) 胆汁添加异搏定代谢物体系被拒绝A+1质量数455.300的M H⁺离子峰质谱图
 (b) 胆汁添加异搏定代谢物体系被保留m/z 455.288峰质谱图
 (c) 异搏定M H⁺离子理论质谱图

图6 阐述了一个质量数符合精确质量数过滤要求的可以代谢物，经同位素轮廓过滤后被除去的又一个例子。XIC图中保留时间30-30.5min的脱甲基小峰，其精确m/z 为441.279，与校正后的脱甲基异搏定m/z比仅相差4mD；因此通过精确质量过滤后这些峰仍被保留在AMPXIC图中，但是通过同位素轮廓过滤，可以很好的从AMPXIC去除这些峰。比起代谢物校正后的质谱图（图6c），图6a中离子的M+1峰丰度高于代谢物，M+2的丰度更是高出很多，因此被过滤掉。用MS/MS测定可以进一步证明该结果。相反，被保留的峰不仅具有高的精确质量，同时具有与脱甲基异搏定一致的同位素轮廓图。通过质量精度和同位素轮廓匹配双重过滤，可以去除可疑的峰，而在AMPXIC图上可以保留下正在的药物相关的色谱峰。

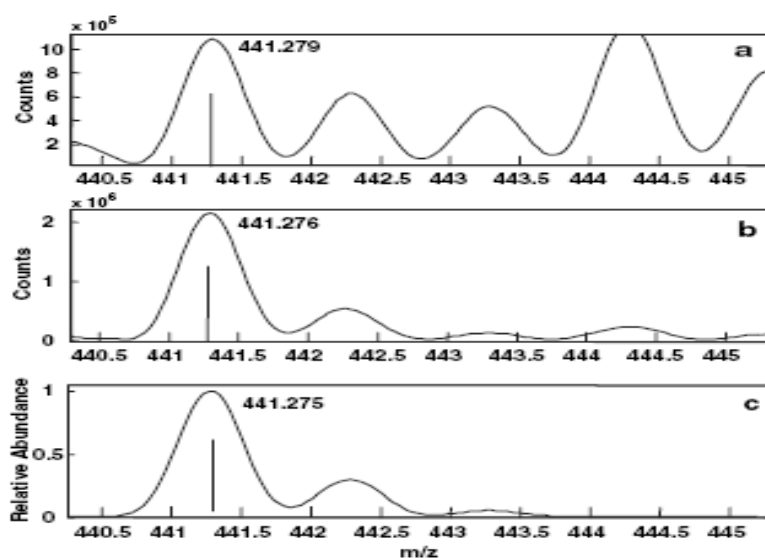


图6 (a) 胆汁添加异搏定代谢物体系被拒绝A+1的质量数441.279离子峰质谱图
 (b) 胆汁添加异搏定代谢物体系被保留m/z 441.276峰质谱图

结论

通过精确质量和同位素轮廓过滤相结合, MassWorks作为一种新的数据处理软件, 可以用于快速而又有效的从复杂的生物基质中鉴定代谢物。该方法运用相同的校正程序, 在整个处理过程中对质量轴、质谱峰形变异和随机噪声进行校正。通过校正, 可以在单分辨四级杆质谱上测定胆汁基质中代谢物的精确质量数。在三重四级杆多种扫描模式下, 通过校正可以测定精确质量数, 从而扩大了其在代谢物鉴定和其它物质定性中的使用。在给定感兴趣代谢物化学式的基础上, 通过精确质量和同位素轮廓过滤, 可以得到比XIC更高选择性的AMPXIC图, 其结果与用放射性标记后的代谢物用放射性检测器得到的结果一致。通过校正, 关键代谢物的假阳性基质峰可以很好的被过滤, 而针对一些假阴性的干扰, 我们可以通过MS/MS进一步确证, 其是否存在。该方法也可以广泛用于其它领域的物质结构鉴定, 诸如降解物鉴定、杂质鉴定、修饰蛋白鉴定以及痕量有毒化学和生化物质。此外, 该方法还可以用于代谢物或其它结构鉴定中MS/MS精确质量数的测定。

参考文献

1. Korfmacher WA. Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies. CRC Press: Washington DC, 2005.
2. Busch KL, Glish GL, McLuckey SA. Mass Spectrometry/Mass-Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry. VCH Publishers: New York, 1988.
3. Clarke NJ, Rindgen D, Korfmacher WA, Cox KA. Anal. Chem. 2001; 73: 430A.
4. Zhang H. Proc. 51st ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, Montreal, Canada, June 8–12, 2003.
5. Zhang H. Rapid Commun. Mass Spectrum. 2003; 38: 1110.
6. Blom KR. Anal. Chem. 2001; 73: 715.
7. Gu M, Wang YD, Kuehl D. Spectroscopy May, 2005.
8. Grange AH, Winnik W, Ferguson PL, Sovocool GW. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005; 19: 2699.
9. Gu M, Wang YD, Zhao XG, Gu ZM. Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, June 5–9, 2005; Poster No. 050.
10. Zhao XG, Gu ZM, Gu M, Wang YD. Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics, San Antonio, June 5–9, 2005; Poster No. 067.
11. Storm T, Hartig C, Reemtsma T, Jekel M. Anal. Chem. 2001;73: 589.
12. McTavish D, Sorkin EM. Drugs 1989; 38: 19.
13. Brogden RN, Benfield P. Drugs 1996; 51: 792.
14. Kantharaj E, Tuytelaars A, Proost PEA, Ongel Z, Assouw HPV, Gilissen RAHJ. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2003; 17:2661.
15. Sun L, Zhang SQ, Zhong DF. Acta Pharmacol. Sin. 2004; 25:121.
16. Von Richter O, Eichelbaum M, Schonberger F, Hofmann U.J. Chromatogr. B 2000; 738: 137.



MassWorks中国总代理:
绿绵科技有限公司

北京市北四环西路68号左岸工社806室(100080)
电话:010-82676061/2/3/4/5/6/7 传真:010-82676068
沈阳市和平区南一马路109号力创大厦503室(110001)
电话:024-23879100/8588/3099 传真:024-23876558
E-mail:info@lumtech.com.cn
Http:// www.lumtech.com.cn

华东地区授权代理:
上海磐和电子科技有限公司

上海莲花南路1500弄梅陇镇新都会19号商务楼606室
邮编:201108
电话:021-33581021、33581022
传真:021-33581023
E-mail:Massworks@impactlabinc.com
Http:// www.impactlabinc.com