

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

(思路生科, 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种领域研究，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。但即使在如此高的质量精度下，仍然会存在好几个候选的化学式，必须依靠我们去选择和推断。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。而且不幸的是，在所有上述情况下，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，不可能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级类型质谱仪上，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=239 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。

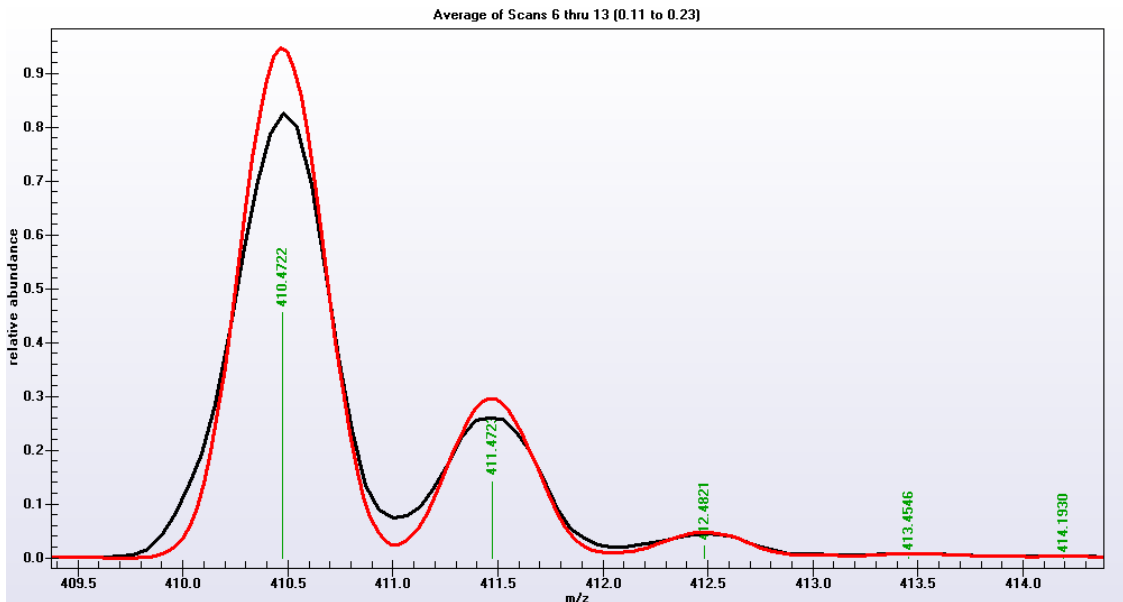


图 1. 标准离子的校正前质谱图（黑线）和校正后质谱图（红线）

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。

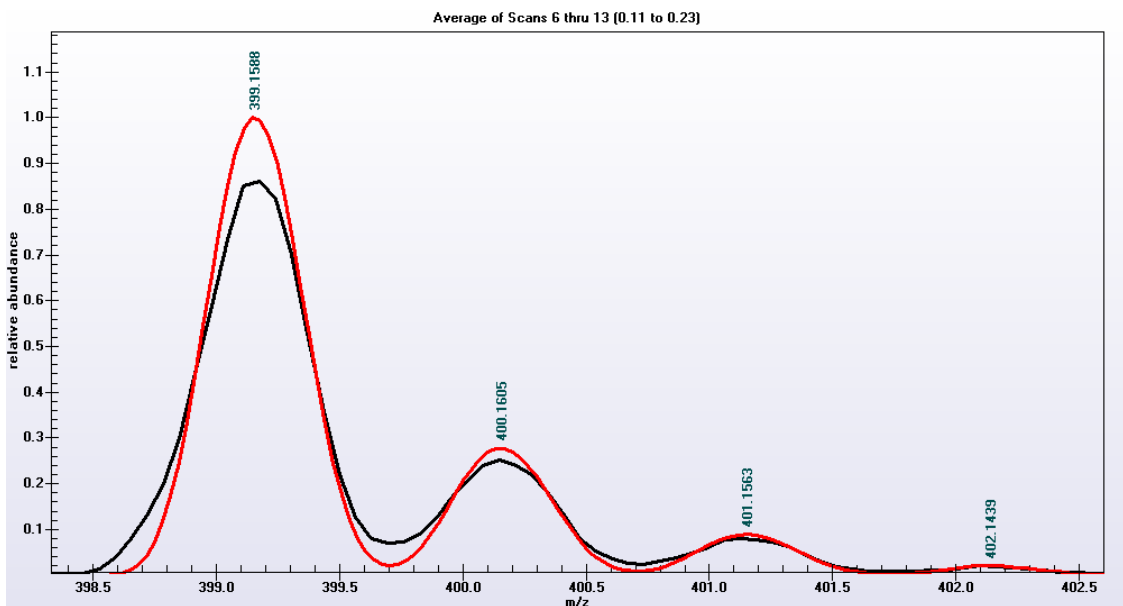


图 2. 未知离子的校正前质谱图（黑线）和校正后质谱图（红线）

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 (PPM)	DBE
1	C25H23N2OS	399.15311	-0.0001	0	15.5
2	C4H19N16OF2PNa	399.15311	-0.0029	-7	2.5
3	C20H27N2FP2Na	399.15312	-0.0108	-27	8.5
4	C10H27N10OS3	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。

致谢

感谢俄亥俄州辛辛那提的宝洁分析部门的 Robert Strife 博士设计了这篇文章的盲样测试方法并在三重四级杆上完成了实验操作。

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