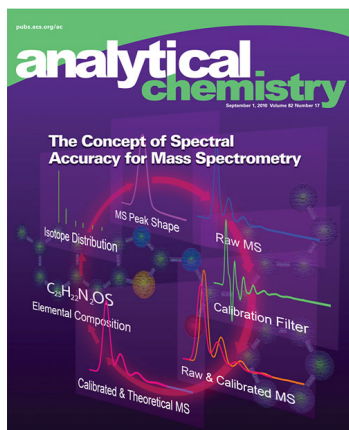


美分析化学封面文章：Mass Works 谱图准确度

思路生科公司(Cerno Bioscience) 的创始人王永东博士, 于 2006 年发明 MassWorks 软件, 并获得当年 Pittcon 创新产品大奖。MassWorks 运用专利的校正方法, 首次在单位质量分辨率质谱(如四极杆 GC/MS、LC/MS) 上实现了精确质量测定的功能, 并可提高各种高分辨质谱(如 TOF、FTMS、Orbitrap) 的质量测定准确度。此后, MassWorks 又引入“谱图准确度”的概念, 结合质量准确度, 可在以上各种质谱上排除更多候选化学式, 获得更确定的元素组成、并实现精确的化合物分析。

最近, 王永东博士撰文“The Concept of Spectral Accuracy for Mass Spectrometry”(质谱的谱图准确度概念), 发表于全球分析化学领域影响力最高的刊物 *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 7055–7062, 并成为 2010 年 9 月号 *Anal.Chem.* 的封面文章。

有理由相信, 谱图准确度的概念必将得到更广泛的重视, 并将对今后的质谱应用产生更深远的影响。



美国《分析化学》(Anal. Chem.) 封面文章:

The Concept of Spectral Accuracy for Mass Spectrometry

在引文中作者谈到: “虽然质谱显示得跟光谱不同, 但对分析化学家来说, 两者是相似的。我们从历史和理论蕴藏的角度进行仔细审视, 发现两者具有惊人的相似性。这里, 我们引入“谱图准确度”(Spectral Accuracy) 的概念——一个为了更好地理解已知的质量准确度 (Mass Accuracy) 的伴生概念, 它可以让质谱拥有我们以前认为质谱不可能获得的能力。”

在引入谱图准确度概念之前, 作者首先介绍

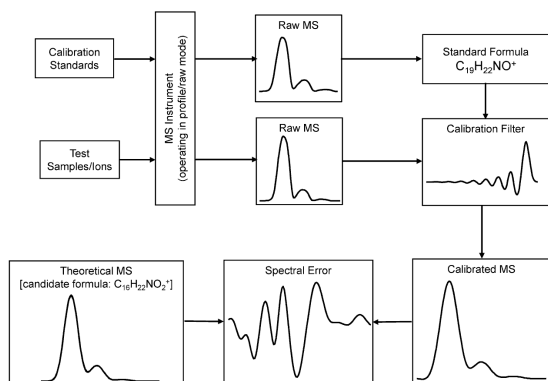
了质谱数据采集方式的历史。在质谱仪器发展的早期, 由于当时的数据系统和存贮能力有限, 质谱的数据量和数据采集的速度对人们来说是巨大的。因此, 早期的质谱为减少原始质谱数据, 均采用棒状图 (centroid)。至今, 现代的质谱仍然使用这种算法, 即使数据通讯速度和存贮能力对大多数系统已经不再是障碍。棒状图的确将数据量减少了 10~100 倍, 但代价却是——丢失了大量的信息, 包括噪音特性、离子信号线性、质谱干扰离子、和同位素的精细特征。因为棒状图的数据离散性, 相关的信息损失和非线性, 以及质量的定位误差, 质谱棒状数据不容易应用分子光谱中常用的那些化学计量学方法, 比如: 差分, 导数分析, 多元回归或任何定性地鉴定或定量分析。

在质谱准确度和元素组成测定的小节里, 作者回顾了质量准确度测定的意义。早期报道认为 5ppm 质量准确度对于获得确信的化学式是足够的。*J. Organic Chemistry* 期刊要求投稿人用同样水平 (即 <5 ppm) 的精确质量测定结果才能表征新合成的化合物, 这成了一个准则, 并已成了使用高分辨质谱研发者的工业标准, 和制药及其它工业最终用户的工业标准。然而也有不同的观点。比如最近, 质谱分辨率在一些新型 FTMS 中已达到 1,000,000:1, 质量准确度甚至可达 100 ppb。但对于一个真实样品 ($C_{25}H_{23}N_2OS^+$) 的 ESI 谱, 在 100 ppb 范围内将会有 7 个候选化学式, 即使排除掉 2 个超过一个 Na 的 (因为认为带的是单电荷, 但即使这样还是存在排除掉正确分子式的风险), 还有 5 个候选。这告诉我们, 单纯的质量准确度是不够的。

此后, 作者提出用 Profile 模式采集原始质谱数据, 并提出系统的谱图准确度计算的算法。

在应用部分, 作者举例了谱图准确度的神奇应用。比如在用单四极杆质谱测试 400 Da 的某已知样品时, 如果仅按照质量准确度 (17 ppm) 来预测, 将获得 4110 个候选化学式, 但当引入谱图准确度计算后, 正确的分子式 $C_{25}H_{23}N_2OS^+$ 在 4110 个候选化学式中排名是第二位, 谱图误差仅为 1.0%, 理论计算和获得的质谱图几乎完美重叠。应注意的是, 即使用 5 ppm (2 mDa) 质量准确度去筛选, 仍有 411 个候选物。该例子不仅展示了使用单四极杆质谱做未知物测定的可能性 (即使

单四极杆质谱永远无法精细地区分那些同位素的特征), 同时也说明在区分大量的候选化学式时, 谱图准确度比质量准确度重要得多, 而不用去管质谱的分辨率。最近系统的研究表明, 使用高质量准确度的 Orbitrap FTMS, 用中等的 15,000 分辨率, 基于 MassWorks 谱图准确度算法, >99% 的不正确的候选化合物能被有效去除。



图示: 在单位分辨率质谱上运用综合的质量校正方法和谱图准确度计算

一些较高分辨率的 TOFMS 仪器对时间相关的波动比较敏感, 比如温度波动, 因此有必要引入内标确保质量准确度。然而据报道, 单四极杆质谱却有很高的质量准确度校正稳定性; 而且更重要的是, 使用外标时的谱图准确度仍可保持一周或更长时间。这使得在传统质谱上可以做很多有趣的应用, 比如, 正确地识别在 EI 电子轰击源中产生的分子内部的离子碎片。

另一种应用是混合物的精确分析, 包括定性和定量。在质谱实验中缺少谱图准确度, 可能会引入质谱干扰, 在谱图准确度计算时可考虑, 以容纳增加的离子并完成离子混合物的精确分析。一种独特的功能是使用全面的质谱校正过程。先前报道的精确混合物分析的例子包括: 对尼古丁 (M-H)⁺ 和分子离子 M⁺ 的 EI 碎片质谱重叠进行评价。放射性 C 标记的药物代谢物研究, 这里天然和 ¹⁴C 标记的母离子质谱重叠, 研究由于丢失氢气分子产生的共流出的氧化产物。在石化应用中分析更多复杂混合物等。在所有这些例子中, 作为谱图准确度计算的结果, 能够同时获得组分的相对浓度, 从而同时完成定性和定量分析。

谱图准确度还可评价仪器、诊断仪器的状态。比如, 质谱检测器饱和会影响 TOF 类质谱, 计算后发现缺少谱图准确度可以体现和证实这一点。相似的, 其它仪器或硬件相关的问题也可以通过谱图准确度计算被诊断出来。例如, 标样 Cyclosporin

A 的 TOF 谱, 经过零离子阈值 (zero ion threshold) 测定, 用制造商建议的饱和限, 结果却是较差的谱图准确度 (9.4%), 这揭示了系统误差。文中图 4B 的谱图重叠显示: A+1 同位素簇显示比预期较低的丰度, 而 A+2、A+3 有更严重的强度降低, 这和 TOF 检测器饱和是相反的, 因此可提供给质谱用户一个重要的工具来诊断仪器, 并进一步改善 TOF 的操作条件。这也可以为将来下一代 TOF 仪器的研发提供建设性的反馈。

其它的谱图准确度应用的例子还有, 有些化学品元素的同位素丰度和从地球化学、石油产品中衍生出来的丰度不同。在此情况下, 对于给定的元素组成缺少谱图准确度, 反映出同位素丰度的变化, 可能是一个或多个元素, 它提供了另一种用于同位素比测量的方法, 而无需使用高度专门的质谱硬件如同位素比值质谱或加速器质谱和/或燃烧过程。

在质谱和分子光谱间有一种有趣的相似性。对大多数红外光谱的应用来说, 由于中红外谱区域的指纹可解释各种振动带, 中红外区域 (类似于高分辨的质谱) 被认为具有独特的重要性, 可以可靠地鉴定有机化合物。然而近红外 (类似于单位质量分辨的质谱), 有许多重叠的二级和三级频谱 (overtone), 具有较低的光学分辨率, 被认为不适于定性分析。直到 20 年前更多先进的化学计量学方法发展起来, 近红外光谱才有了越来越广泛的应用。就像近红外光谱发展一样, 单位质量分辨率的质谱, 虽然不能在谱图上精细分辨质谱的特性, 但在高的谱图准确度时可以更稳定、更容易地获得较宽的线性范围, 从而可以弥补较低分辨率, 帮助解决甚至是非常难的分析难题。

结论

虽然质谱是独特的, 但当使用了 Profile 采集模式、更全面的质谱校正方法, 获得更高的谱图准确度时, 质谱和其它的分析技术显示出惊人的相似性。这种过程使质谱可以大大受益于许多已被研究者在其它领域证实的方法。不仅能在传统单四极杆质谱上获得合理的质量准确度、进行化学式测定; 谱图准确度的概念还能被用于诊断质谱仪器, 并可在高分辨率仪器上进一步提高化学式测定的能力。其它更多挑战性的应用包括: 从石化分析到蛋白质组应用的复杂混合物的定性和定量分析, 都可受益于谱图准确度。最后别忘了, 在谱图准确度的层面上来认识质谱和其它谱学, 发现在各种分析测试技术之间获得了惊人的一致, 这种发现是非常令人振奋的!

中国苦水玫瑰精油中部分天然产物的质谱分析与元素组成的确定

周围*, 张雅珩, 周小平

(甘肃出入境检验检疫局技术中心 甘肃 兰州 730020)

摘要: 本文用一台四极杆低分辨质谱与气相色谱联用, 对天然玫瑰精油中的色谱共流出物和难确定的饱和正构烷烃化合物进行了质谱解析。结果表明, 使用美国 Cerno Bioscience 公司研发的质谱 MassWorks 软件, 其 MSIntegrity™ 技术可以使四极杆质谱仪器提高 100 倍的质量精度, 精度达 5ppm; 全自动同位素峰形检索技术 CLIPS 通过谱图准确度的匹配, 实现了分子式的准确识别。

关键词: MassWorks; 玫瑰精油; 天然产物; 元素组成确定

Mass spectrum analysis and elemental composition identification of partial natural products in essential oil of Chinese Kushui rose

ZHOU Wei*, ZHANG Ya-Heng, ZHOU Xiao-Ping

(Gansu Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Lanzhou 730020, China)

Abstract: In this study the mass spectrum of components flowing out together in chromatography and n-alkanes difficult to identify in natural rose essential oil were analyzed by a GC-MS with modest resolution quadrupoles. The MSIntegrity™ technology of MassWorks software developed by Cerno Bioscience can increase 100 times mass accuracy of modest resolution typical of quads, the mass accuracy can achieve 5 ppm. Calibrated Line-shape Isotope Profile Search (CLIPS) identified molecular formula accurately by the spectral accuracy matching.

Key words: MassWorks; rose essential oil; natural products; elemental composition identification

质谱作为未知物定性的四大技术之一, 为我们提供了以下信息: 1 分子离子的质量 (确定未知物的元素组成); 2 分子碎片的质量 (推测未知物的结构); 3 同位素离子的质量与丰度 (确定未知物的元素组成)。尽管质谱硬件技术和软件技术在不断发展, 用质谱对未知化合物分子的定性和解析仍然充满着不确定性。为了提升定性的能力, 需要质谱具有更准的精确质量如: TOF, Orbitrap, FT; 需要提供更多的碎片信息, 如: 串联质谱、Q-TOF、Q-TRAP 等等。这样一来, 高昂的采购成本、使用成本以及不断更新的质谱设备的费用便不言而喻。一种新的质谱软件技术 MassWorks 结合了高分辨精确质量和低分辨质谱同位素离子丰度比的概念, 为将推测可能的元素组成变为确定的元素组成提供了一个良好的手段。关于这项技术国内外的专

家已经有数篇论文发表^[1-3], 但是针对天然产物中化合物的解析尚未见报道。我们在一台低分辨 GC/MS 联用仪上应用 MassWorks (美国 Cerno Bioscience 公司) 软件对天然苦水玫瑰精油的中难确证的化合物进行了质谱解析, 获得了令人满意的结果。

1 实验部分

1.1 仪器及材料

安捷伦 7890A /5975C 气质联用仪; MassWorks (美国 Cerno Bioscience 公司) 软件。

1.2 供试样品

天然苦水玫瑰精油, 产地, 甘肃永登。

1.3 分析条件

色谱条件:

色谱柱: DB-1701 (60m × 0.25mm × 0.25μm)

程序升温: 60℃ (1min) 2℃/min 280℃ (10min)

载气: H₂; 流速: 1.0mL/min; 分流/不分流进样器: 分流比: 100:1, 温度: 260℃; 进样量: 0.6μL。

质谱条件:

采集方式: 原始扫描 (轮廓图); 扫描区间: 50-500 Da; 离子源温度: 230℃; 四级杆温度: 150℃;

阈值: 0 (这样的设置是为了采集的质谱信号无损失)。

质谱采集的原始谱图经校正后, 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, 是准确识别目标化合物分子式的重要工具。可以用一个已知的化合物作为外标获得质量数校正和峰形校正, 也可以用全氟三丁胺作为内标获得质量数校正和峰形校正。我们采用了全氟三丁胺作为内标进行校正, 具体校正过程略。图 1 是天然玫瑰精油的质谱总离子流图 (注: 质谱图是轮廓图而不是棒状图)。

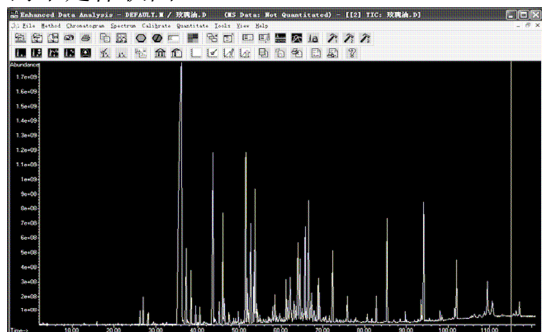


图 1 天然玫瑰精油质谱总离子流图

Fig. 1 TIC of natural rose essential oil

2 结果与分析

根据美国化学会志对文章作者的征稿通知, “...分子量低于 1000 的物质, 其测量的质量与计算质量的误差应在 5ppm 内。”^[4]。美国 Cerno Bioscience 公司研发的质谱 MassWorks 软件, 其 MSIntegrity™ 技术可以使四极杆质谱仪器提高 100 倍的质量精度, 精度达到 ppm 级, 可以符合质谱解析的基本要求。而全自动同位素峰形检索技术 CLIPS

使得谱图准确度真正实现分子式的准确识别。

2.1 对可能存在共流出化合物成分的分析

色谱共流出化合物的质谱解析是一个非常困难的问题, 尤其对于天然产物中未知物的分析难度就更大。天然中国苦水玫瑰精油中主要成分是香茅醇, 其含量占 40%-60%。用 DB-1701 石英毛细管色谱柱分离色谱图均显示为一个具有良好色谱峰型的大组分。见图 1, 图 2。通过质谱 NIST 谱库和香精香料专业谱库检索均显示该化合物为香茅醇。又用标准的香茅醇作为对照, 也确证了质谱的检索结果, 见图 3。

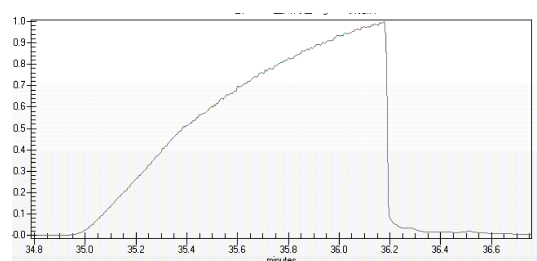


图 2 中国苦水玫瑰精油中的主成分, 色谱保留时间 35-36.5min, 放大示意图

Fig.2 The main component with retention time of 35-36.5min in essential oil of Chinese Kushui rose

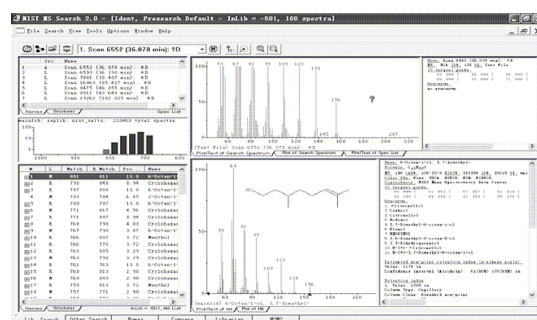


图 3 对从 35-36.5min 任意时间段, 用 NIST 或香精香料库检索均得到同一结果: 香茅醇 citronellol

Fig.3 The same search results (citronellol) from NIST and Flavor libraries in any time segment of 35-36.5min

为了确证该色谱大峰中是否还有其他的共流出化合物成分的存在, 我们用 MassWorks 软件对香茅醇这个色谱峰重新进

行轮廓模式下的质量图的检索，见图4。

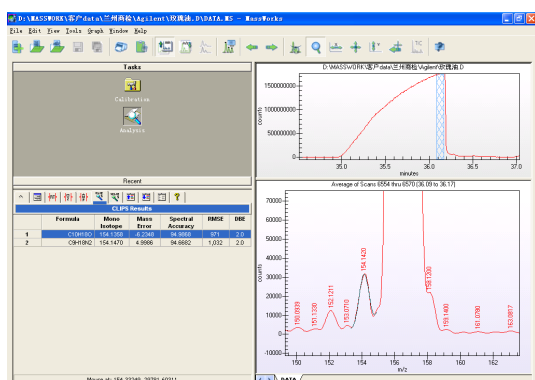


图4 MassWorks 软件显示了色谱共流出的大峰中有三个物质存在

Fig.4 Three components in chromatography flowing out together showed by MassWorks software

从图4中可以十分清楚的看到，在检索的质谱处有三个分子离子的质谱峰存在。即分子离子 m/z 为 156.1561（同位素峰为 157.1383）的一个大峰， m/z 为 154.1420 的分子离子峰， m/z 为 152.1211 的分子离子峰。用软件的 CLIPS 功能对这三个分子离子峰进行检索，得到了三种不同的分子式，然后通过 NIST 库对分子式的检索得到对应的化合物，见图5、6、7、8、9、10，表1、2、3。

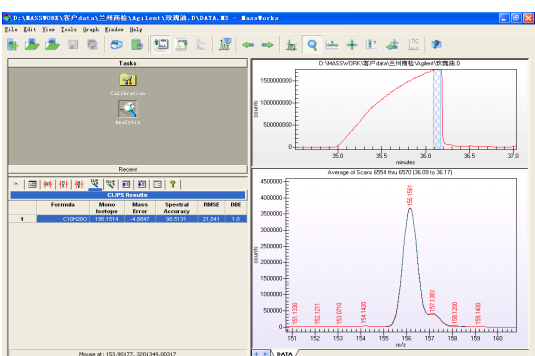


图5 MassWorks 软件显示了分子离子峰 m/z 为 156.1561 与理论精确质量的误差和谱图精度

Fig.5 The spectral accuracy and mass error of molecular ion peak (m/z 156.1561) with mono isotope value showed by MassWorks software

表1 分子离子峰 m/z 156.1561 的 MassWorks 检索结果

Tab.1 The search result of molecular ion peak (m/z 156.1561) from MassWorks software

分子式	排序	(理论) 精确质量	质量误差 mDa	谱图精度
$C_{10}H_{20}O$	1	156.1514	-4.6847	98.5131

根据 Massworks 软件得到的分子式，通过 NIST 谱库检索，见下图6，确定该化合物为香茅醇。

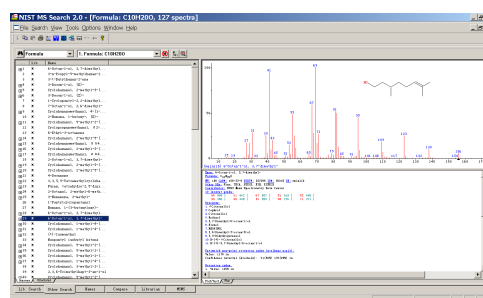


图6 分子式为 $C_{10}H_{20}O$ 的 NIST 库检索 (香茅醇)

Fig.6 The search result (Citronellol) of molecular formula $C_{10}H_{20}O$ in NIST

表2 分子离子峰 m/z 154.1420 的 MassWorks 检索结果

Tab.2 The search result of molecular ion peak (m/z 154.1420) from MassWorks software

分子式	排序	(理论) 精确质量	质量误差 mDa	谱图精度
$C_{10}H_{18}O$	1	154.1358	-6.2348	94.9868

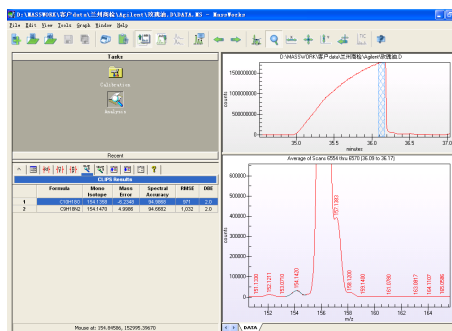


图7 MassWorks 软件显示了分子离子峰 m/z 为 154.1420 与理论精确质量的误差和谱图精度

Fig.7 The spectral accuracy and mass error of

molecular ion peak (m/z 154.1420) with mono isotope value showed by MassWorks software

根据 Massworks 软件得到的分子式, 通过 NIST 谱库检索, 见下图 8, 确定该化合物为橙花醇。

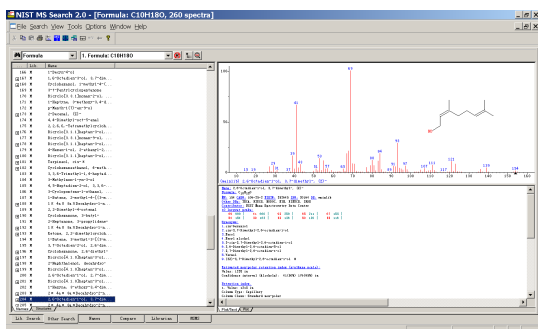


图 8 分子式为 C10H18O 的 NIST 库检索 (橙花醇)

Fig.8 The search result (Nerol) of molecular formula C10H18O in NIST

表 3 分子离子峰 m/z 152.1211 的 MassWorks 检索结果

Tab.3 The search result of molecular ion peak (m/z 152.1211) from MassWorks software

分子式	排序	(理论) 精确质量	质量误差 mDa	谱图精度
C ₁₀ H ₁₆ O	1	152.1201	-0.9849	94.9751

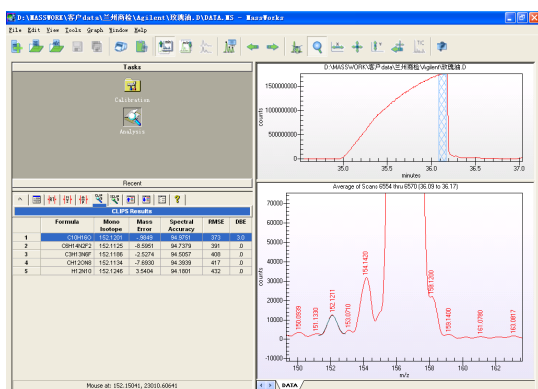


图 9 MassWorks 软件显示了分子离子峰 m/z 为 152.1211 与理论精确质量的误差和谱图精度

Fig.9 The spectral accuracy and mass error of molecular ion peak (m/z 152.1211) with mono isotope value showed by MassWorks software

根据 Massworks 软件得到的分子式, 通过 NIST 谱库检索, 见下图 10, 确定该化合物为柠檬醛。

物为柠檬醛。

我们又采用了二维气质 (GC-GC/MS) 技术, 对这个色谱大峰进行了二次分离切割实验, 证实了上面检索结果的准确性。

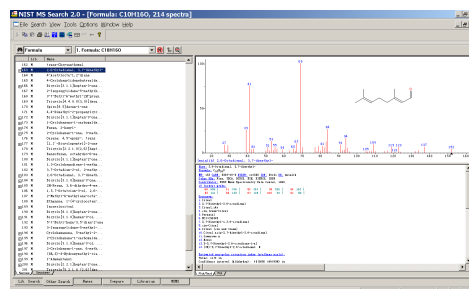


图 10 分子式为 C10H16O 的 NIST 库检索 (柠檬醛)

Fig.10 The search result (Citral) of molecular formula C10H16O in NIST

2.2 对同系物的分析

正构饱和脂肪烃 (烷烃) 质谱图的突出特征是有因为 (C_nH_{2n+1})⁺ 碎片离子系列, 即 m/z 43, 57, 71, 85, ... 离子 (间隔 14u 的离子系列)。但是, 随着 m/z 增大, 分子离子的丰度迅速下降, 碳数大于 10 的正构饱和脂肪烃分子离子峰非常难以确定^[5]。对于天然产物中所含的正构烷烃, 利用 NIST 质谱库解析是非常困难的。一般是用标准的正构烷烃进行对比来确定, 或者是用色谱保留指数来确定。显然这是非常麻烦和不容易做到的。我们利用 MassWorks 软件对 Agilent7890/5975 所获得的天然中国苦水玫瑰精油质谱图中的两个正构烷烃的色谱峰进行处理, 见图 11、12、13、14, 表 4, 5。

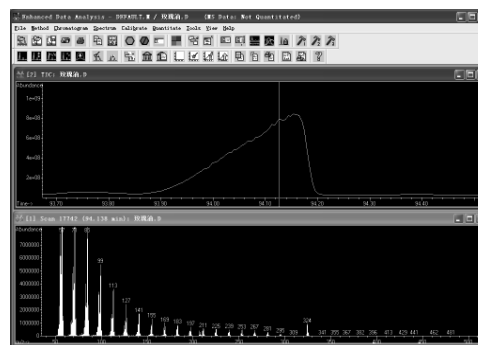


图 11 中国苦水玫瑰精油中色谱保留时间 93.85-94.2 min 组分的质谱图 (棒状图), 放大示意图

Fig.11 The mass spectrum (centroid) of component with retention time of 93.85-94.2 min in essential oil of Chinese Kushui rose

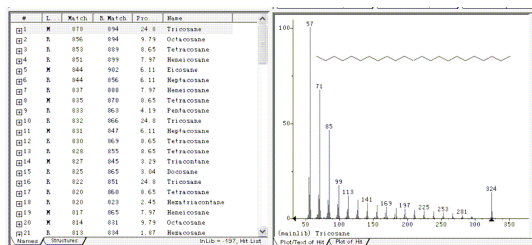


图 12 NIST 库检索结果无法确定具体的正构饱和脂肪烃分子

Fig.12 The specific n-alkanes could not be confirmed by the NIST library

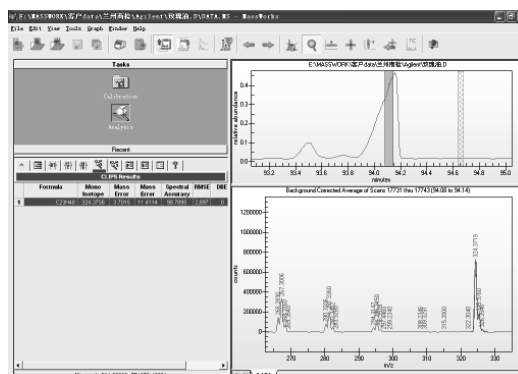


图 13 MassWorks 软件显示了在色谱保留时间 94.10min 出峰 的分子离子峰 324.3719 与理论精确质量的误差和谱图精度

Fig.13 The spectral accuracy and mass error of molecular ion peak (m/z 324.3719) with mono isotope value showed by MassWorks software

表 4 分子离子峰 m/z 324.3719 及碎片离子的 MassWorks 检索结果

Tab.4 The search result of molecular ion peak (m/z 324.3719) and fragment ion peaks from MassWorks software

	分子式	排序	(理论) 精确质量	质量误差 mDa	谱图精度
分子离子	C ₂₃ H ₄₈	1	324.3756	3.7015	98.9994
碎片	C ₂₁ H ₄₃	1	295.3450	-8.5236	97.3610
碎片	C ₂₀ H ₄₁	1	281.3360	-15.1737	96.7446
碎片	C ₁₉ H ₃₉	1	267.3006	4.5763	98.2772

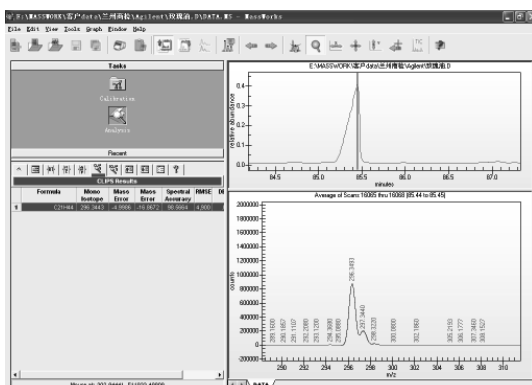


图 14 MassWorks 软件显示了在色谱保留时间 85.4min 出峰 的分子离子峰 296.3493 与理论精确质量的误差和谱图精度

Fig.14 The spectral accuracy and mass error of molecular ion peak (m/z 296.3493) with mono isotope value showed by MassWorks software

表 5 分子离子峰 m/z 296.3493 的 MassWorks 检索结果

Tab.5 The search result of molecular ion peak (m/z 296.3493) from MassWorks software

分子式	排序	(理论) 精确质量	质量误差 mDa	谱图精度
C ₂₁ H ₄₄	1	296.3443	-4.9888	98.7895

我们又采用正构烷烃标准品在相同色谱条件下对以上检索结果进行了确证，证实了上述结果的准确性。

3 结论

毫无疑问，低分辨质谱法给出的是整质量数，高分辨质谱法给出的是精确质量数，但是它们都无法直接准确的给出化合物的唯一的确定元素组成。一种新的质谱软件技术结合了高分辨精确质量和低分辨质谱同位素

离子丰度比的概念,将推测可能的元素组成变为确定的元素组成。

a 普通低分辨质谱如GC/MS采集的质谱图经MassWorks软件校正后,可以获得目标化合物分子的精确质量数,并得到分子式。结合谱图准确度,可以获得可靠的分子式识别结果。

b CLIPS检索结合NIST库检索,可以准确地定性天然产物中的未知成分。

c 当采用NIST库检索遇到多个待选分子式具有类似的匹配值(MV)和类似的反向匹配值(RMV)时,MassWorks可以帮助我们识别唯一的分子式。

致谢

作者感谢北京绿绵科技有限公司李卫建先生和欧阳伟民先生在实验方面的给予的指导和帮助。

参考文献

[1] Erve, J.C.L.; Gu, M.; Wang, Y. D.; DeMaio, W.; Talaat, R.E.;

Spectral Accuracy of Molecular Ions in an LTQ/Orbitrap Mass Spectrometer and Implications for Elemental Composition Determination, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009, 20 (11), 2058-2069.

[2]. Wang, Y.; Prest, H.; Accurate Mass Measurement on Real Chromatographic Time Scale with a Single Quadrupole Mass Spectrometer, *Chromatography*, 2006, 27 (3), 135-140.

[3] Gu, M.; Wang, Y.D.; Zhao, X.G.; Gu, Z.M.; Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20 (5), 764-770.

[4] Patty, K.-L. Fu; Claudia Turro; Energy Transfer from Nucleic Acids to Tb(III): Selective Emission Enhancement by Single DNA Mismatches, *Journal of the American chemical society*, 1999, 121 (1), 1-7.

[5] 王光辉;熊少祥;有机质谱解析,化学工业出版社,北京,2005。

精确质量数在单四极杆质谱 定性分析农药中的应用

李雪生^{1,2}, 李子昂¹, 王正全¹, 李卫健³, 潘灿平¹

(1. 中国农业大学理学院应用化学系, 北京 100193; 2. 广西大学农药与环境毒理研究所, 南宁 530005;
3. 北京绿绵科技有限公司, 北京 100193)

摘要 利用 MassWorks 软件对 GC/MS 采集的目标农药谱图进行校正后, 实现了在单位分辨率质谱上测定 6 种农药化合物的精确质量数, 质量误差小于 0.02; 在精确质量数基础上, 进一步采用同位素峰形校正检索技术 (CLIPs), 实现了对目标农药分子式的准确识别, 建立了在单位分辨率质谱上准确测定农药小分子化合物的方法, 提高了单位分辨率质谱的定性能力. 通过对丙草胺及吡蚜灵两种农药的质谱碎片所获得的 MassWorks 精确质量数及元素组成推导其质谱碎裂机理, 通过对碎片的精确质量数测定可提高对目标物定性的准确性.

关键词 精确质量数; 元素组成; MassWorks 软件; 离子碎裂机理; 农药

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2010)12-2383-07

质谱可通过测定精确质量得到物质元素组成及分子式信息, 是识别或确证化合物的重要工具. 单四极杆气-质联用仪因具有价格便宜、操作简单、灵敏度高和适用性广等特点, 在环境^[1]、药物与医学^[2~6]、食品安全^[7,8]和其它领域得到了广泛应用, 已成为常规分析仪器之一. 在未知物的定性领域, 通过谱库检索或质谱高精度元素组成以获得可能的匹配结果, 再结合经验, 特别是相关碎片信息和其它谱学的结果, 甚至通过人工合成去确证一个未知化合物. 但谱库检索或元素组成预测出的结果并不一定可靠, 且因谱库容量的有限性及未能得到及时更新或新化合物不断涌现而得到错误的结果, 目前可被用于准确的相对分子质量测量的仪器有扇形场质谱仪、傅里叶变换-离子回旋共振 (FT-ICR) 质谱仪、飞行时间 (TOF) 质谱仪和 Orbitrap 质谱仪^[9,10].

但这些高分辨质谱仪价格昂贵, 且使用及维护成本高昂, 使其在测定准确相对分子质量的应用中受到限制.

很多元素都具有同位素且在自然界的丰度为一个固定值, 可将质谱图中同位素峰的相对丰度用于准确相对分子质量的校正计算. 美国 Cerno Bioscience 公司^[11~13]利用同位素规律开发出一种用于校正计算准确相对分子质量的软件 MassWorks, 该软件通过建立校正函数方程, 并将同位素效应、仪器噪音过滤及峰形补偿纳入函数方程中^[14], 经过计算校正 RAW SCAN 模式质谱图并获得精确相对分子质量值. MassWorks 可以处理各种单分辨力 GC/MS 或 LC/MS 采集的数据, 以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.

该方法在药物分子及代谢产物的鉴定^[15,16]及环境与安全^[17~19]研究中已得到应用, 但在农药的定性分析中还鲜见报道.

本研究尝试在单位分辨质谱仪 GC/MS 上通过 MassWorks 校正同位素峰形从而测量多种未知农药的准确相对分子质量及其元素组成, 对农药分子进行准确定性, 并对农药产生的主要质谱碎片进行精确质量及元素组成测定, 对农药的质谱碎裂机理进行解释, 进而实现对农药的准确定性, 探讨一种在低分辨率质谱仪上对农药分子进行快速、灵敏和可靠定性分析的方法.

收稿日期: 2010-04-07.

联系人简介: 潘灿平, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农药残留与环境毒理学的研究. E-mail: canping@cau.edu.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

GC/MS(Agilent 公司 6890N/5973 MSD, Agilent MSD ChemStation D.01.00 SDK); EI 离子源, 电子能量 70 eV; 色谱柱(HP-5MS, 5% Phenyl Methyl Siloxane, 30.0 m × 250 μm × 0.25 μm); 数据采集(Data acquisition): Raw scan; 阈值(Threshold): 0; 扫描速率(Sampling rate): 2²(A/D 样品数为 4). 全扫范围: m/z 100 ~ 400. 柱温: 60 °C (0.5 min) $\xrightarrow{20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 200 °C (0.5 min) $\xrightarrow{7\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 260 °C (0.5 min) $\xrightarrow{25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280 °C (10 min); 进样口: 250 °C; MS Quad: 150 °C; MS 源: 230 °C.

农药标样: 哒螨灵、丙草胺、莠去津、六氯苯、灭蝇胺及 2,4-D 甲酯的纯度均在 98% 以上(国家标准物质中心), 先用少量丙酮溶解, 涡旋 2 min, 用丙酮定容, 配制浓度为 50 mg/kg 的混合标准溶液备用.

1.2 外标校正法的建立

在样品数据采集前, 单独运行 PFTBA 校正气用于 MassWorks 校正分析. 在本方法中, 设置色谱柱载气流速及其它全部质谱参数和样品分析一致. 输入运行开始后打开 PFTBA 的分钟值: 0.20 min 将阀打开, 1.2 min 将阀关闭. 设定 Solvent Delay 为 0 min; 设定 Injection source 为 Manual; 选择非程序升温, 运行时间为 1.5 min, 选择不分流进样方式, 确保该方法没有压力脉冲或色谱柱流速改变.

2 结果与讨论

2.1 农药分子量的测定

用 MassWorks 打开样品总离子流图, 以 2,4-D 甲酯的保留时间为中心, 选取 0.05 min 时间窗口, 显示其质谱图, 以 MassWorks 测定的精确质量为基准, 以离子电荷数(Charge)为 1, 质量误差(Mass tolerance)为 0.2, C, H, O, N, S, P, F, Cl 及 Br 为可能含有的元素, 推测 2,4-D 甲酯目标药物的分子式. 由于其待选分子式个数均在 6000 以上, 很难对目标物真正的分子式进行识别. 利用 MassWorks 软件对采集的一级全扫描质谱图进行校正计算, 可以获得 2,4-D 甲酯目标药物的精确质量数为 233.9720, 与理论的准确分子量误差为 0.013. 由于 MassWorks 可以极大地提高单位分辨质谱的质量精度(误差低于 0.02), 因此设定质量误差为 0.02, 以同样的元素组成为条件, 推测 2,4-D 甲酯目标药物的分子式, 可以显著地减少待选分子式的个数至 116 个, 虽然能明显降低准确识别分子式的难度, 但要从 116 个分子式中准确识别目标物的分子式, 难度仍然很大.

2.2 农药分子式的准确识别

MassWorks 有助于单位质量分辨质谱测定目标物的精确质量, 且可以进一步实现目标物分子式的准确识别. 利用 MassWorks 同位素峰形校正检索技术(CLIPs), 通过同位素峰形轮廓匹配原则, 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, 有助于从质量数相近的分子式中筛选出真正的目标物的元素组成结果, 并将其元素组成排列于待选元素组成的前列, 实现目标物分子式的准确识别. 图 1 和表 1 均为 MassWorks 准确识别的 2,4-D 甲酯分子式的结果, 如以质量误差排序, 2,4-D 甲酯 0.013 的误差只能排在前 20 位待选分子式的第 15 位, 但由于 2,4-D 甲酯的同位素峰形与仪器获得目标物的校正同位素峰形相似度最大, 达到 97.36%, 排在全部 116 个待选分子式的第一位, 且得到不饱和度值为 5 的信息也可进一步对结构进行确证, 从而实现了目标物分子式的准确识别. 当然, 要对其结构式进行推导还需要与化学及光谱等技术手段的进一步的结合.

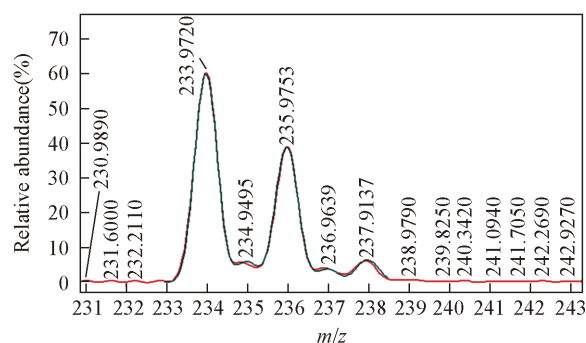


Fig. 1 Accurate mass measurement of pesticide 2,4-D methyl ester

Table 1 Accurate elemental composition measurement for pesticide 2,4-D methyl ester

Entry	Formula	Mono isotope	Mass error/mDa	Mass error/ppm	Spectral accuracy	RMSE ^a	DBE ^b
1	C ₉ H ₈ O ₃ C ₁₂	233.985	13.0495	55.774	97.3613	52	5
2	C ₇ H ₄ O ₃ N ₂ C ₁₂	233.9599	-12.1026	-51.7266	97.2492	54	6
3	C ₆ H ₄ O ₂ N ₄ C ₁₂	233.9711	-0.8692	-3.7149	97.225	55	6
4	C ₅ H ₄ ON ₆ C ₁₂	233.9824	10.3642	44.2968	97.1737	56	6
5	C ₃ ON ₈ C ₁₂	233.9572	-14.7879	-63.2038	96.5571	68	7
6	C ₁₁ H ₄ N ₂ C ₁₂	233.9752	3.1536	13.4784	96.5414	68	10
7	C ₂ N ₁₀ C ₁₂	233.9684	-3.5545	-15.1921	96.4267	70	7
8	C ₁₂ H ₄ OC ₁₂	233.9639	-8.0798	-34.5333	96.3402	72	10
9	C ₅ H ₈ O ₆ C ₁₂	233.9698	-2.2066	-9.431	95.9026	81	1
10	C ₄ H ₈ O ₅ N ₂ C ₁₂	233.981	9.0268	38.5807	95.7884	83	1
11	C ₂ H ₄ O ₅ N ₄ C ₁₂	233.9559	-16.1253	-68.9199	94.9464	100	2
12	CH ₄ O ₄ N ₆ C ₁₂	233.9671	-4.8919	-20.9082	94.7959	103	2
13	H ₄ O ₃ N ₈ C ₁₂	233.9783	6.3415	27.1035	94.6367	106	2
14	C ₂ H ₁₂ O ₈ C ₁₂	233.9909	18.9228	80.8763	93.919	120	-4
15	CH ₈ O ₉ C ₁₂	233.9545	-17.4627	-74.636	93.1539	135	-3
16	H ₈ O ₈ N ₂ C ₁₂	233.9658	-6.2293	-26.6243	92.9994	138	-3
17	H ₇ O ₁₂ Cl	233.9626	-9.3966	-40.1612	79.3055	408	-3
18	C ₂ H ₃ O ₉ N ₂ Cl	233.9527	-19.2926	-82.4568	78.7004	420	2
19	CH ₃ O ₈ N ₄ Cl	233.9639	-8.0592	-34.4451	78.5856	422	2
20	C ₄ H ₇ O ₉ Cl	233.9779	5.8595	25.0437	78.556	423	1

a. RMSE is the root mean squared error between the calibrated spectrum and the theoretical spectrum; *b.* DBE is double bond equivalents.

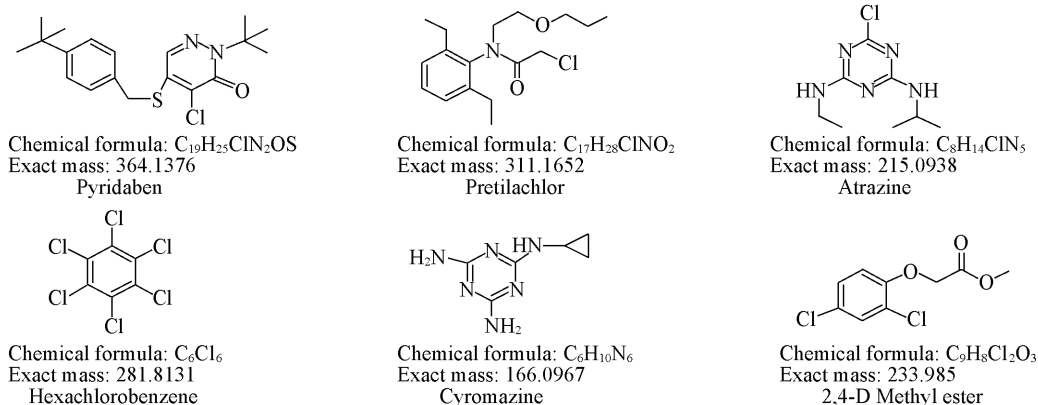
2.3 其它目标农药的识别

采用上述方法对其它 5 个农药化合物所对应质谱峰的精确分子量及元素组成进行识别, 发现 5 个色谱峰的保留时间在 9 ~ 19 min 之间, 分子量及信噪比(*S/N*) 分别在 150 ~ 400 及 50 ~ 300 之间. 采用同样方法, MassWorks 软件可准确地识别 5 个随机选取目标农药的精确质量数, 分别为 281.8187, 215.0811, 166.0867, 311.1530 及 364.1576, 待测化合物经 MassWorks 处理所得结果见表 2, 6 种目标物的元素组成结果均列在待选化学式的第一位, 所选目标农药的准确质量数及元素组成均得到准确确定. 结合所得精确分子量及元素组成信息, 在农药范畴内可很容易地对随机选取的 5 个色谱峰所对应的化合物进行定性, 它们分别为六氯苯、莠去津、灭蝇胺、丙草胺(和/或丁草胺)和吡啶灵(图 2).

Table 2 Accurate elemental composition measurement for six pesticides

Formula	<i>t_R</i> /min	Rank *	Accurate mass	Mono isotope	Mass error/mDa	Mass error/ppm	Spectral accuracy	RMSE	DBE
C ₉ H ₈ O ₃ Cl ₂	8.45	1	233.9850	233.9720	13.0495	55.774	97.3613	52	5
C ₆ Cl ₆	9.12	1	281.8131	281.8187	-5.5837	-19.8132	98.9807	149	4
C ₈ H ₁₄ N ₅ Cl	9.34	1	215.0938	215.0811	12.6732	58.9228	98.9003	40	4
C ₆ H ₁₀ N ₆	9.59	1	166.0967	166.0867	9.9944	60.1755	98.7926	608	5
C ₁₇ H ₂₆ O ₂ ClN	13.34	1	311.1652	311.1530	12.2068	39.2308	96.5423	26	5
C ₁₉ H ₂₅ ON ₂ ClS	18.97	1	364.1376	364.1576	-19.9882	-54.8888	95.7317	68	8

* The rank of the elemental formula for six pesticides based on their spectral accuracy.

**Fig. 2** Chemical structure of six pesticides

经计算, 6 个农药 MassWorks 精确质量数与其理论分子量误差分别为 0.0130495, -0.0055837, 0.0126732, 0.0099944, 0.0122068 及 -0.0199882. 值得注意的是, 对于 $t_R = 13.34$ min 处的色谱峰, 在农药范畴内, 精确质量数 $M = 311.1530$, 元素组成为 $C_{17}H_{26}O_2ClN$ 且不饱和度为 5 所对应的可能有互为同分异构体的丙草胺和丁草胺, 与高分辨质谱仪一样, 仅依据精确质量数及元素构成, MassWorks 无法完成对同分异构体的准确识别.

2.4 信噪比及色谱分离度对结果的影响

对于同一个化合物, 样品的信噪比 (S/N) 越低, 测定的质量精度就越差, 从而给准确性目标物的元素组成带来困难. 从表 2 及表 3 中的数据可以看出不同化合物间的信噪比对其质量精度的影响, 选取的 6 个化合物中 S/N 最低的为 32.1 ($t_R = 9.34$ min), 最高为 296.9 ($t_R = 9.59$ min), 采用 MassWorks 测定后的精确质量数误差分别为 58.9228×10^{-6} 和 60.1755×10^{-6} , 说明在满足一定 S/N 要求后 (通常为 $S/N > 10$), 不同化合物间的质量精度误差与其 S/N 大小间无明显关系, 而是由化合物本身的结构等特性决定的. 而 $t_R = 9.59$ min 所对应农药的质量误差 (60.1755×10^{-6})、校正和理论谱图的匹配误差 ($RMSE = 608$) 均最高, 原因应在于其色谱分离不完全 (VB 峰, 分离度 $R = 0.15$) 造成不能完全分离的化合物同位素峰之间相互重叠, 从而影响同位素峰形校正结果的准确度 (图 3).

Table 3 Chromatographic peak parameters of six pesticides

Pesticide	t_R /min	S/N	Peak type*	Ion fragment, m/z						
				1	2	3	4	5	6	7
2,4-D Methyl ester	8.45	52.1	BB	199	175	166	145	133	111	
Hexachlorobenzene	9.12	181.7	BB	249	214	177	142			
Atrazine	BB9.34	32.1		200	173	125	104			
Cyromazine	9.59	296.9	VB	151	138	123	109			
Pretilachlor	13.34	78.7	BB	282	262	238	225	202	176	162
Pyridaben	BB18.97	89.9		309	207	147				

* B means the peak start or stop from the base line; V means the peak start or stop from a peak valley.

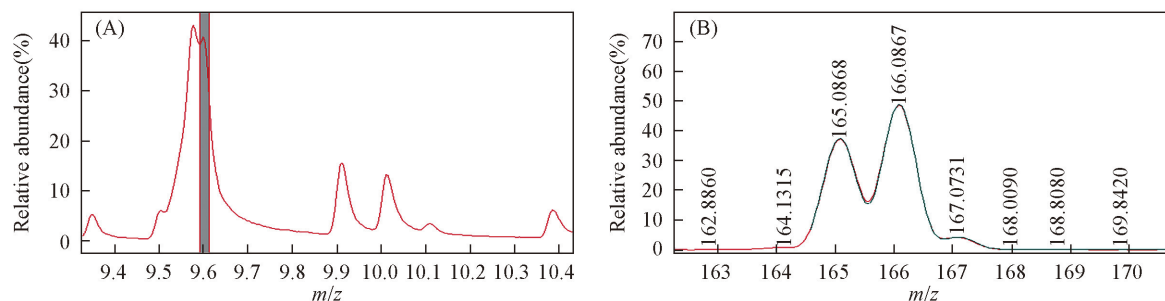


Fig. 3 Mass-scan chromatogram of cyromazine (A, $t_R = 9.59$ min) and its accurate mass measurement (B)

2.5 与谱库检索结果的比较

采用 NIST02 通用库对试验的 6 个农药质谱信息进行检索, 结果发现, 除六氯苯的匹配度较低 (39.4%) 且排在第二位外, 其它 5 个农药与谱库的匹配度均在 82.5% ~ 98.1% 之间, 且均排在第一位, 质谱碎片有很好的匹配性. 但谱库检索结果具有明显的不足: 化合物质谱碎片信息的获得必须是在标准的质谱条件 (电子能量 70 eV) 下, 且仅根据检索匹配度很难得到准确可信的结果, 特别是对于未知物或复杂结构性物质的定性, 必须结合高分辨率质谱或对质谱信息进行科学解析或与标准物质进行比对. 如芦楠等^[20]采用 NIST 谱库检索烟草中某一未知挥发性成分时发现, 其质谱峰与芳樟醇和异松油烯的匹配度分别为 90% 和 87%, 仅凭谱库检索并不能准确定性, 但通过在 GC-TOF-MS 上测得的精确质量数可推断该峰为异松油烯. 张庆芳等^[21]通过 NIST 库检索结合质谱解析, 分别对毒死蜱及氯氰菊酯的多个 γ 射线主要辐射降解产物进行结构推导, 但结果表明, 这种通过匹配度结合质谱解析对未知物结构进行确证的方法, 其结果仍然缺乏准确性. 此外, 杭义萍等^[22]研究发现, 对于芳环、稠环和小分子烃类组分的 NIST 检索结果正确率较高; 但相对分子量较大的组分检索结果不可靠, NIST

存在着一定的局限性, 需要采用标样确证才能得出正确结果.

2.6 质谱碎裂机理研究

精确质量数 $M = 311.1530$ 对应的农药可能有互为同分异构体的丙草胺和丁草胺, MassWorks 与高分辨质谱仪一样, 仅依据精确质量数及元素构成无法对它们进行准确识别, 因此试图以丙草胺/丁草胺及吡啶灵为例, 以说明 MassWorks 在化合物质谱碎裂行为及在同分异构体识别研究中的应用.

采用 2.1 节和 2.2 节所述的方法, 对在上述质谱条件下吡啶灵及丙草胺/丁草胺产生的主要质谱碎片(见图 4)进行 MassWorks 精确质量数及元素组成测定, 通过所得到的精确质量数、元素组成及 DBE 等信息(表 4)并结合化合物的结构特点, 对上述 2 个农药的质谱裂解机理进行了推导, 从中判断出 $t_R = 9.59$ min 的化合物为丙草胺. 具体碎裂机理见图 5 和图 6.

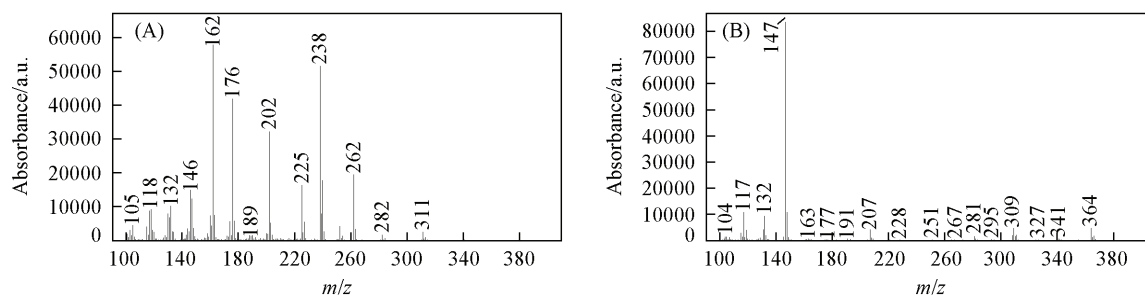


Fig. 4 GC-MS spectra of pretilachlor(A) and pyridaben(B)

Table 4 Accurate mass and elemental composition measurement for GC-EI-MS ion fragment of pretilachlor and pyridaben

Pesticide	Entry	Accurate mass	Formula	Mono isotope	Mass error/mDa	Mass error/ppm	Spectral accuracy	RMSE	DBE
Pyridaben ($M = 364$)	2	309.0816	$C_{15}H_{18}ON_2SCl$	309.0828	1.2366	4.0009	95.6928	85	7.5
	1	147.1148	$C_{11}H_{15}$	147.1174	2.5755	17.5066	98.7996	501	4.5
Pretilachlor ($M = 311$)	1	262.1730	$C_{16}H_{24}O_2N$	262.1807	7.704	29.3853	99.3653	62	5.5
	1	238.0978	$C_{13}H_{17}ONCl$	238.0999	2.0669	8.6808	99.2462	146	5.5
	1	225.0874	$C_{12}H_{16}ONCl$	225.0920	4.6419	20.6224	98.5073	90	5.0
	1	202.0966	$C_{13}H_{16}ON$	202.1224	26.0033	128.6512	98.0944	285	7.0
	2	176.0981	$C_{11}H_{14}ON$	176.1075	9.4391	53.6012	99.0461	180	5.5
	2	162.1225	$C_{11}H_{16}N$	162.1283	5.7745	35.6182	98.5639	393	4.5

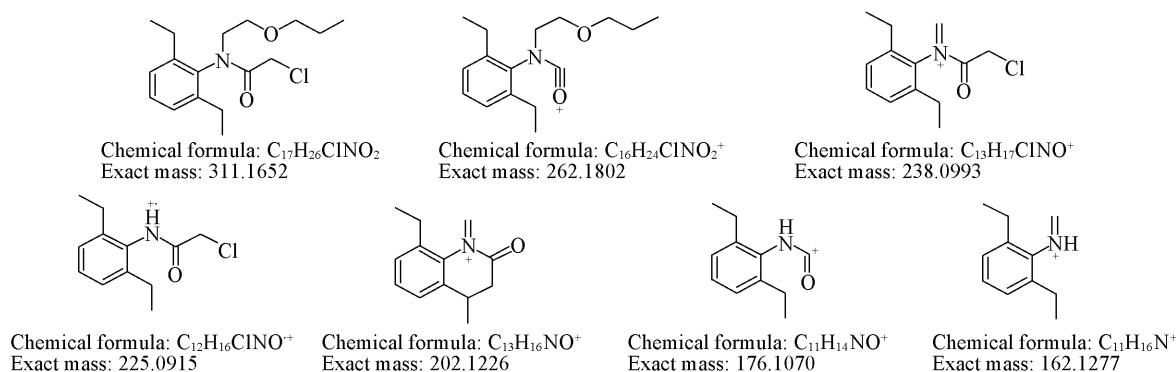


Fig. 5 Ionization and dissociation rules of pretilachlor

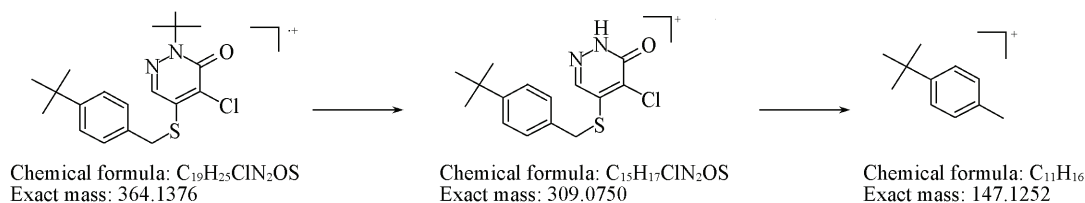


Fig. 6 Ionization and dissociation rules of pyridaben

采用 MassWorks 对丙草胺的质谱碎片进行精确质量数及元素组成测定可知, 其碎片 m/z 262 的精确质量数为 262.1730, 元素组成为 $C_{16}H_{24}O_2N$, 质量误差为 0.007704, 不饱和度为 5.5, 为偶电子碎片离子, 峰形匹配度达 99% 以上, 可以推断碎片 m/z 262 对应结构为分子失去一个 $-CH_2Cl$ 基团后所得, 是在 $C=O$ 不饱和游离基中心的诱导下发生 α 断裂所至. 同样, 由碎片 m/z 238 的精确质量及元素组成测定结果, 可推断该碎片是由于同时在饱和杂原子游离基中心氮原子及氧原子的双重诱导下发生 α 断裂而形成的较稳定的偶电子碎片离子. 碎片 m/z 225 的 DBE 值为 5, 是一个奇电子离子碎片, 由元素组成测定结果推导其应为丙草胺分子离子发生氢重排至饱和杂原子 N 上后再通过 α 断裂产生的碎片离子. 而碎片 m/z 202 是在碎片 m/z 238 基础上经过氢原子重排并失去一个 HCl 后所得的碎片. 同理, 丙草胺的其它主要质谱碎片碎裂机理推导结果如图 5 所示.

从 MassWorks 测定的哒螨灵质谱碎片精确质量数及元素组成结果可知, 碎片 m/z 309 的元素组成为 $C_{15}H_{18}ON_2SCl$, 不饱和度为 7.5, 为分子离子发生简单的 σ 断裂后失去 N 原子上的 $-C_4H_7$ 基团而形成的不稳定碎片, 丰度为 18.0%, 易进一步裂解为基峰碎片 m/z 147, 不饱和度为 4.5, 且由测定元素组成, 可知不含杂原子, 应是在 S 原子作用下发生 α 断裂所致(图 6).

3 结 论

MassWorks 可在四级杆质谱(GC/MS 和 LC/MS)上测定化合物的精确质量数, 在低分辨上实现高分辨的功能. 本研究利用 MassWorks 实现了在单位分辨率质谱(GC/MS)上测定农药分子的精确质量数, 利用同位素峰形校正检索技术(CLIPs), 实现了对目标化合物分子式的准确识别, 从而建立了一项在单位分辨率质谱上准确测定未知物的精确质量数及元素组成的新方法, 提升了单位分辨率质谱仪的定性能力. 在高分辨质谱仪分析中, 仅依据精确质量数及元素构成无法对互为同分异构体的化合物进行准确识别. 采用 MassWorks 软件可通过对其质谱碎片进行进一步的精确质量数确认及元素组成推导出质谱碎裂机理, 从而可实现对结构的准确区分. 虽然对于 GC-MS 数据可采用与标准谱库进行快速检索从而对目标物定性, 但谱库收录化合物数量毕竟有限, 对于新颖目标物及非标准质谱条件下获得的质谱数据则无法进行准确检索, 而对于液-质等分析手段, 目前无标准谱库可比对, GC-MS 及 LC-MS 结合 MassWorks 的应用, 可在单位分辨率质谱上建立准确测定未知物的精确质量数及元素组成的新方法, 提升并扩展了单位分辨率质谱的定性能力及应用范围.

参 考 文 献

- [1] Adalberto M. F., Fábio N. dos S., Pedro A. de P. P.. *Microchemical Journal*[J], 2010, **96**: 139—145
- [2] Papoutsis I. I., Athanaselis A. S., Nikolaou D. P.. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*[J], 2010, **52**(4): 609—614
- [3] Dongre G. V., Karmuse P. P., Nimbalkar M. M.. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*[J], 2005, **39**: 111—116
- [4] LIU Yue(刘悦), LIU Zhi-Qiang(刘志强), LI Hui-Lin(李慧琳), SONG Feng-Rui(宋凤瑞), LIU Shu-Ying(刘淑莹). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2008, **29**(9): 1727—1735
- [5] Yoshito Inoue, Toshihiro Shinka, Morimasa Ohse, Hiromichi Ikawa, Tomiko Kuhara. *Journal of Chromatography B*[J], 2006, **838**(1): 37—42
- [6] ZHANG Jie(张洁), YAN Li-Juan(严丽娟), LIN Lin(林琳), CHEN Wen-Gui(陈文贵), SONG Xiu-Yu(宋秀宇), YAN Xiao-Mei(颜晓梅), HANG Wei(杭伟), HUANG Ben-Li(黄本立). *Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)*[J], 2008, **29**(11): 2171—2173
- [7] Agüera A., de Kok A.. *Comprehensive Analytical Chemistry*[J], 2005, **43**: 339—368
- [8] QIAN Min(钱敏), LIU Jian-Zhen(刘坚真), BAI Wei-Dong(白卫东), CAI Pei-Dian(蔡培佃). *China Condiment(中国调味品)*[J], 2009, **9**(34): 101—104
- [9] McLuckey S. A., Wells J. M.. *Chem. Rev.* [J], 2001, **101**: 571—606
- [10] Ma S. G., Chowdhury S. K., Alton K. B.. *Curr. Drug Metab.* [J], 2006, **7**: 503—523
- [11] Zhao X. G., Gu Z. M., Gu M.. *Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics*[C], San Antonio, 2005: Poster No. 067
- [12] Gu M., Wang Y. D., Zhao X. G.. *Proc. 53rd ASMS Conf. Mass Spectrometry and Allied Topics*[C], San Antonio, 2005: Poster No. 050

- [13] Gu M., Wang Y. D., Zhao X. G., Gu Z. M. . Rapid Commun Mass Spectrom[J], 2006, **20**: 764—770
- [14] Wang Y. D. . Methods for Operating Mass Spectrometry(MS) Instrument Systems, US 6983213[P], 2003
- [15] LIU Ke(刘可), MA Bin(马彬), WANG Yong-Dong(王永东), CHEN Xiao-Yan(陈笑艳), ZHONG Da-Fang(钟大放). Acta Pharmaceutica Sinica(药学学报)[J], 2007, **42**(10): 1112—1114
- [16] Erve C. L. J., Gu M., Wang Y. D., de Maio W., Talaat E. R. . Journal of the American Society for Mass Spectrometry[J], 2009, **20**(11): 2058—2069
- [17] Chen J., Gu M., Wang Y. . LC-GC North America[J], 2008, **26**(9): 938—945
- [18] Kuehl D., Wang Y. . LC-GC North America[J], 2007, **25**(4, Suppl.): 10—16
- [19] Kuehl D., Wang Y. . BioPharm. International[J], 2006, **19**(7): 32—38, 45
- [20] LU Nan(芦楠), NIE Cong(聂聪), XIE Jian-Ping(谢剑平), GUO Yin-Long(郭寅龙). Tobacco Science & Technology(烟草科技)[J], 2010, (3): 26—33
- [21] ZHANG Qing-Fang(张庆芳), WANG Feng(王锋), HA Yi-Ming(哈益明). Scientia Agricultura Sinica(中国农业科学)[J], 2010, **43**(5): 1041—1049
- [22] HANG Yi-Ping(杭义萍), HUANG Ying(黄英). Speciality Petrochemicals(精细石油化工)[J], 2007, (3): 67—72

Application of Accurate Mass and Elemental Composition Determination for Pesticides Identification Using a Unit Mass Resolution Gas Chromatography/Mass Spectrometry

LI Xue-Sheng^{1,2}, LI Zi-Ang¹, WANG Zheng-Quan¹, LI Wei-Jian³, PAN Can-Ping^{1*}

(1. Department of Applied Chemistry, College of Science, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Institute of Pesticide & Environmental Toxicology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

3. Lumiere Tech. Ltd., Beijing 100080, China)

Abstract On a unit mass resolution mass spectrometer, such as a single quadrupole MS, allowing for only rough mass confirmation for qualitative analysis. In this study, a novel mass spectral calibration technique, MSIntegrityTM implemented in MassWorksTM, is introduced to externally calibrated using a unique procedure that corrects for both mass axis and mass spectral peak shape to facilitate pesticides identification with high mass accuracy, MS data were acquired in profile mode on a unit mass resolution single-quadrupole instrument, even at such a unit mass resolution on a true chromatographic time scale, will now enable the elemental composition determination of unknown ions or ion fragments using a conventional mass spectrometer. This identification capability is further enhanced by a uniquely accurate approach for elemental composition determination through the use of isotope distribution information, CLIPSTM.

Keywords Accurate mass; Elemental composition; MassWorks software; Ion fragmentation mechanism; Pesticide

(Ed. : A, G)

使用MassWorks快速筛查药品中非法添加物

张喆¹, 李卫建², 袁有荣²

(1.北京市药品检验所, 北京 100035 2.北京绿绵科技有限公司, 北京 100080)

Rapid Identification of Chemical Drug Mixed Illegally by MassWorks

Zhang-Zhe, LI Wei-jian, YUAN You-rong

(BEIJING INSTITUTE FOR DRUG CONTROL, Beijing 100035 Lumiere Tech Ltd, Beijing 100080, China)

Abstract: To establish a new quick, accurate, sensitive method for analysing illegal chemical components added into medicine. LC/MS profile data was acquired, and use both mass and peak shape can achieve high mass accuracy. The isotope profile pertinent to the elemental composition, for further illegally added confirmation. Sildenafil was found in one formulation of two. The method is rapid, selective and accurate and can be promote to the rapid method in screening illegally added into TCM or Preparations.

Key words: illegal chemical components; MassWorks; LC/MS; accurate mass; isotope profile filtering

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2010) 增刊-0224-03

LC/MS具有专属性强、灵敏度高的优点, 已越来越多的应用于成分复杂的中成药和保健品非法添加药物成分的鉴别^[1-2]。但由于处理数据的时间较长, 因此如何快速准确的从复杂基质样品的LC/MS数据中鉴定非法添加化学品是加速数据分析的关键步骤。MassWorks软件(美国思路生科公司)具有以下三重功能: 质谱图校正、精确质量数过滤、通过精确质量数和同位素峰形校正(谱图准确度)确定物质元素组成^[3-4]。从而建立了一种快速、灵敏、准确的快速筛查药品中非法添加化学品的办法。

1 材料与办法

1.1 仪器

TSQ Quantum型液相色谱-串联质谱联用仪: 美国ThermoFisher Scientific公司产品, 配有电喷雾电离源(ESI); MassWorksTM质谱分析软件: 美国Cerno Bioscience公司产品。

1.2 药品与试剂

伐地那非对照品(校正用): 由中国药品生物制品检定所提供; 样品1和样品2为购于药店的不同品牌保健品; 甲醇(色谱纯): Merck公司产品; 水为超纯水。

1.3 仪器办法

1.3.1 色谱条件 Venusil Mp C₁₈柱(4.6×250 mm×5 μm); 流动相: V(甲醇):V(水)=70:30; 流速1 mL·min⁻¹; 进样量5 μL。

1.3.2 质谱条件 电喷雾电离源(ESI), 正离子检测模式, 源喷射电压4.0 kV, 一级全扫描(Q1 scan) m/z 5~1 000 u, 图谱采集为profile文件格式。

1.4 数据采集和分析

首先,以1.3中的仪器方法分别采集对照品、样品1和样品2的LC/MS一级全扫总离子流图;然后,使用MassWorks软件,采用外标法,用对照品对质量轴和质谱峰形进行校正,建立校正函数并保存;再将建立的校正函数运用于样品的质谱图,用MassWorks进行自动精确质量筛选可能的非法添加物;最后,用MassWorks测定目标峰的精确质量数和谱图准确度,对筛查出的阳性结果进行确证。

2 结果

2.1 样品的色谱和质谱行为

将待测物用甲醇溶液稀释后进样分析,样品1和样品2的一级扫描离子流图示于图1。

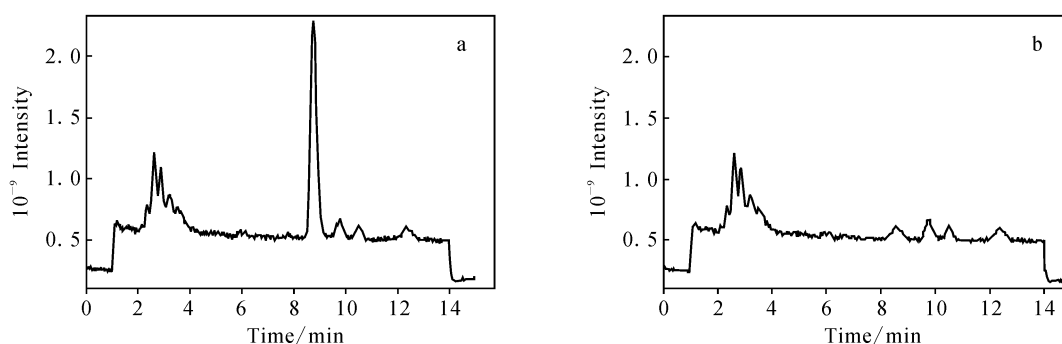


图1 样品1 (a) 和样品2 (b) 的全扫描总离子流图 (ESI+)

2.2 样品中非法添加壮阳化学品的快速筛查

传统四极杆仪器MS校正一般只关注质量误差,因此其质心计算方法得到的质量精度就较差。MassWorks作为一种新的校正方法,同时进行了质量轴校正及峰形校正,并考虑噪声过滤,建立校正函数,为在低分辨质谱上测定未知物的精确质量数和精确质量筛选提供保证。

将建立的校正函数应用到实际样品的质谱图,将可能的非法壮阳添加物的名称和化学式([M+H]⁺、[M+Na]⁺等)输入MassWorks的AMP检索条件栏中,本试验以他达那非(C₂₂H₂₀N₃O₄)、西地那非(C₂₂H₃₁N₆O₄)、伐地那非(C₂₄H₃₂N₆O₄S)为例,然后MassWorks将进行自动精确质量筛选。结果在样品1中检索到西地那非的存在。样品1、2中3种壮阳化学品的精确质量筛选结果示于图2。

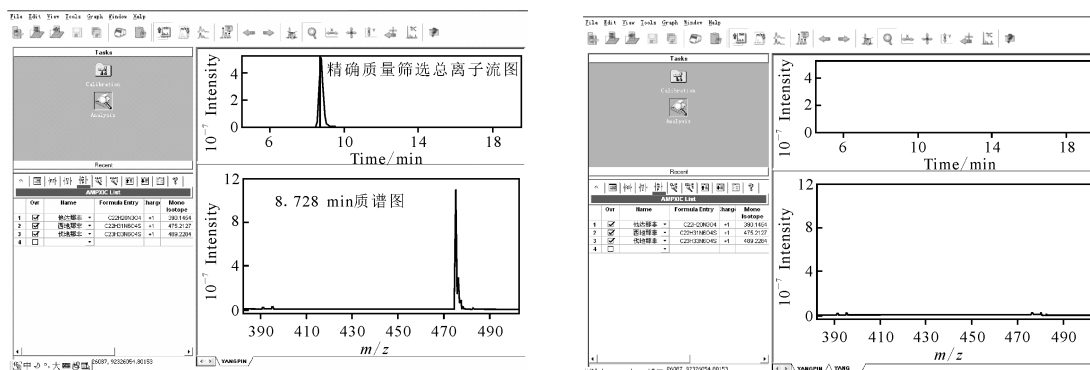


图2 样品1 (a) 和样品2 (b) 中3种壮阳化学品的精确质量筛选结果

2.3 样品1中西地那非的确证

为进一步确证样品1中筛查出的西地那非是否为阳性结果。MassWorks可以进一步测定目标峰的

精确质量数和谱图准确度, 以进行确证。经检索西地那非的理论质谱图与目标峰的质谱图的同位素峰形相似度最高, 进一步确证了样品 1 中非法添加了壮阳化学品西地那非。

3 讨论

通过精确质量过滤, MassWorks 作为一种新的数据处理软件, 在给定感兴趣非法添加物化学式的基础上, 通过精确质量过滤, 获得高选择性的精确质量提取质谱图, 可以很好的过滤假阳性基质峰, MassWorks 快速而又有效的从复杂的中成药和保健品中筛查非法添加化学品; 对于筛选出的阳性结果, MassWorks 通过对质量轴、质谱峰形变异和随机噪声进行校正, 可以在低分辨的 LC/MS 测定目标峰的精确质量数和分子式, 对筛选出的阳性结果进一步确证, 从而保证了筛查结果的可靠性。

参考文献:

- [1] LIU Y f, LI J, XIE Y c, et al. Recent advances and analytic technique on determination of chemical drug mixed illegally in TCPM[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2008, 22(12): 1 067.
- [2] 高 青, 车宝泉, 张 喆, 等. LC-MS/MS法检查中药制剂及保健食品种非法添加的 16种镇静催眠药物[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(2): 142-146.
- [3] GU M, WANG Y D, ZHAO X G, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20: 764-770.
- [4] Yongdong Wang, Harry Prest. Accurate mass measurement on real chromatographic time scale with a single quadrupole mss spectrometer[J]. Chromatography, 2006, 27(3): 135-140.

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, 甘肃 兰州 730020; 2. 绿绵科技有限公司, 北京 100080)

Identification Quinolones Drug' Formulas by MassWorks Combination of Unit-Resolved Mass Spectrometry

ZHOU Wei¹, LI Wei-jian²

(1. Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Technology Center, Lanzhou 730020, China;

2. Lumiere Tech Ltd, Beijing 100080, China)

Abstract: MassWorks calibrates both the mass position and the mass spectral peak shape. We can achieve the high mass accuracy on LC/MS by MassWorks, the mass error is less than 10 mu. Furthermore, the list of possible formulas can be greatly shortened through the Calibrated Line-shape Isotope Profile Search (CLIPS™). So we can exact identify the target molecular formula.

Key words: MassWorks; accurate mass; formula determination; unit mass resolution.

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0126-02

美国Cerno Bioscience公司利用同位素规律开发出一种软件 (MassWorks), 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。本工作以3种药物为例, 建立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

UPLC-Quattro premier质谱联用仪; MassWorks™分子式识别软件; 美国Cerno Bioscience公司产品。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 BEH C₁₈色谱柱 (50 mm×2.1 mm×1.7 μm); 流动相: 乙腈, 0.2%甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~6 min; 流速0.3 mL·min⁻¹; 柱温30 °C; 进样量10 μL。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源, 毛细管电压3.5 kV, 源温100 °C, 脱溶剂气速350 L·h⁻¹, 一级全扫描采集数据, 扫描模式profile mode, 质量扫描范围m/z 300~400。

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上未能得到基线分离, 氧氟沙星的保留时间均为1.67 min, 恩诺沙星的保留时间为1.84 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。试验发现, 尽管氧氟沙星、诺氟沙星在总离子流图上未得到分离, 但由于二者的相对分子质量相差较大, 因此在质谱图上得到了很好的分离。以质量误差0.2 u, 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6 038、8 965、11 133, 这给准确识别目标物真正的分子式带来了困难。

利用MassWorks软件对采集的一级全扫描质谱图进行校正计算, 获得3种目标药物的精确质量数分别为320.143 5、360.181 3、362.153 3 u, 误差分别为2.5、1.7、7.7 mu。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10 mu。因此以质量误差10 mu, 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, 列于表1, 从而降低了准确识别分子式的难度, 但要从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。

2.2 药物分子式的准确识别

MassWorks软件不仅可以在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, 实现目标物分子式的准确识别。MassWorks准确识别氧氟沙星分子式的结果示于图1。如以质量误差排序, 氧氟沙星2.0 mu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。

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	准确分子质量	Masslynx 分子质量	待选分子式个数	MassWorks 分子质量	待选分子式个数
诺氟沙星	C ₁₆ H ₁₉ FN ₃ O ₃	320.141 0	320.2	6 038	320.143 5	123
恩诺沙星	C ₁₉ H ₂₃ FN ₃ O ₃	360.172 3	360.1	8 965	360.181 3	155
氧氟沙星	C ₁₈ H ₂₁ FN ₃ O ₄	362.151 6	362.1	11 133	362.153 3	248

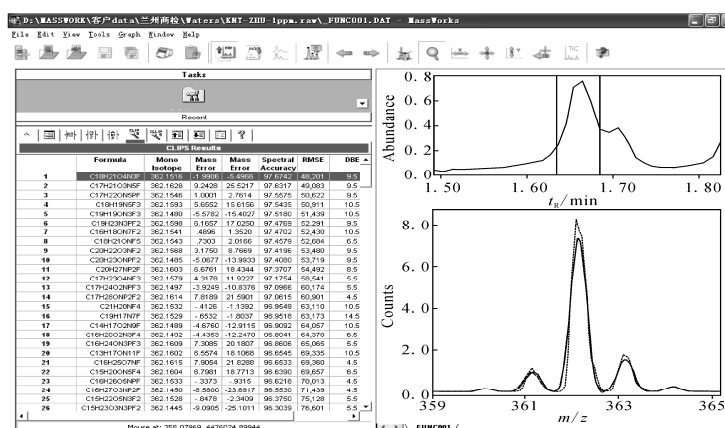


图1 MassWorks 准确识别氧氟沙星分子式结果

3 小结

使用 MassWorks 软件对单位分辨质谱采集的质谱图校正, 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、氧氟沙星分子式, 3 种目标药物的测量结果误差小于 10 mu, 极大地提高了单位分辨质谱在药物中未知物的定性能力。

参考文献:

- [1] MING G, WANG Y, ZHAO X, et al. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system[J]. 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[J]. 药学学报, 2007, 42(10): 1 112-1 114.

MassWorks™结合 GC/MS 测定毒鼠强的分子式

李卫建, 弓俊杰, 欧阳伟民
(北京绿绵科技有限公司, 北京 100080)

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, 已成为许多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。MassWorks™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, 获得目标物的准确质量和分子式; 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^[1-5]。

毒鼠强是一种无色无味的白色晶体粉末, 尽管 1984 年联合国已经禁止使用, 但在一些中毒事件中却经常遇到。气质联用法由于操作简单, 是未知有机物的鉴定常用方法, 该方法需要用目标物的质谱图与标准库中相应质谱图匹配, 实现定性。而对于像毒鼠强之类在标准库中不含有的有机物, 将难以准确定性; 而 MassWorks™软件利用准确质量和谱图准确度实现了对该类有机物的精确定性。

本文以毒鼠强为例, 阐述了 MassWorks™软

件在 Agilent GC/MS 用谱图准确度结合其测定的精确质量数识别未知物分子式的方法。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

Agilent GC/MS 6890 / 5975 联用仪。美国 Cemo Bioscience 公司 Massworks™ 质谱分子式识别软件。以气质调谐液全氟三丁胺 (PFTBA) 作为校正液, 样品在 8.7 min 的未知峰为被测对象。

1.2 仪器条件

采用原始扫描 (raw scan) 模式采集质谱数据, 扫面范围 m/z :40-550, 扫描速率 2², 阈值为“0”; 离子源温度: 230°C, 四级杆温度: 150°C。采用内标法采集样品和校正品的数据, 200 °C 等温分离, 4-12 min 采集样品数据, 目标物在 8.7 min 出峰; 12 min 打开校正阀, 13.5min 关闭校正阀, 采集 PFTBA 数据, 12-13.5 min 期间将倍增器 (EMV) 调至 400V, 以避免 PFTBA 信号饱和。

1.3 数据处理:

图 1 是样品和 PFTBA 的 TIC 图, 并对 TIC 图中一段时间的 PFTBA 进行了标记。MassWorks™软件 (Cerno Bioscience) 可以用标记的 PFTBA 平均质谱图为基础, 对质谱图进行校正, 建立校正函数, 图 2 是 PFTBA 的标准质谱图, PFTBA 丰富的碎片分布, 可以对从 m/z :40-550 全部的质谱图进行校正。MassWorks™独特的校正技术同时对质量轴和质谱峰形 (谱图准确度) 进行校正, 这是在低分辨质谱上测定准确质量的关键, 且谱图准确度尤其重要。将建立的校正应用于未知物质谱图校正 (图 3 即校正流程图), 即可得到目标物的准确质量数, 以目标物单同位素峰准确质量可以获得质量数相似的全部可能待选化学式列表; 以谱图准确度对列表中的化学式重新进行排序, 以实现未知物分子式的精准识别。谱图准确度由目标校正后质谱图与理论质谱图的相似度计算所得。

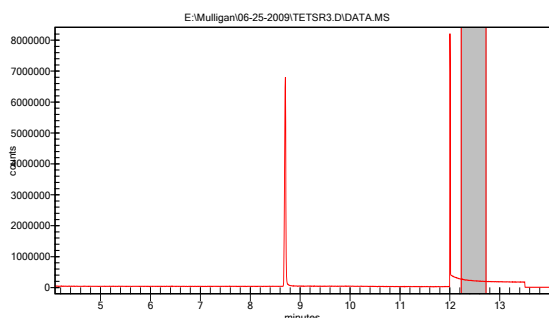


图 1 是样品和 PFTBA 的 TIC 图

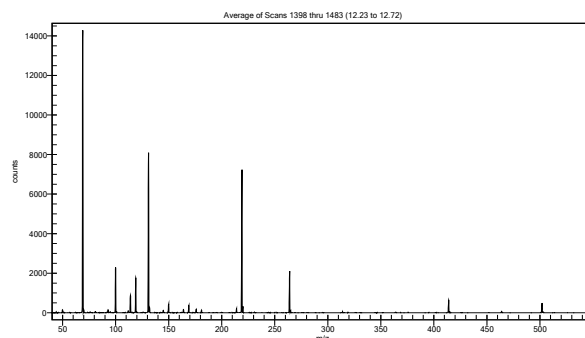


图 2 PFTBA 的标准质谱图

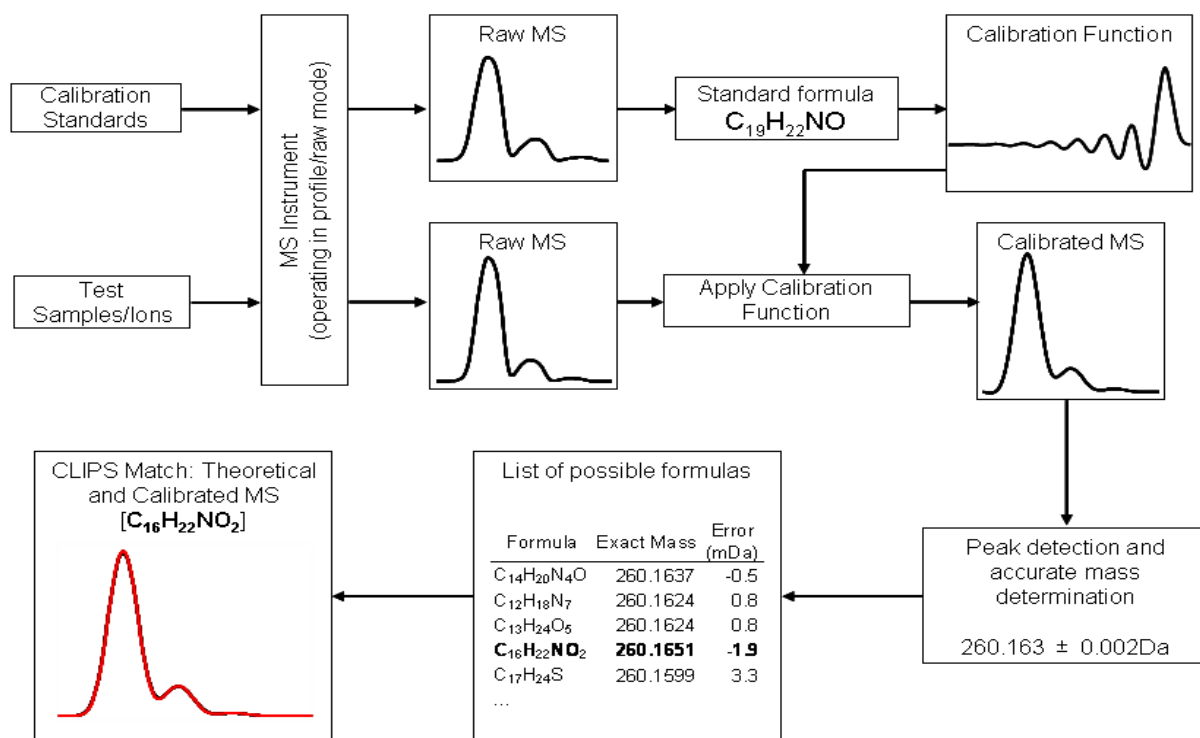


图 3 MassWorks™ 校正流程图

2 结果

MassWorks™软件以第 1372 至 1446 个扫描 (RT=12.08-12.51min)的平均质谱图为基准,建立校准函数。图 4 是 PFTBA 的校正结果报告,报告列出了 PFTBA 全部 10 个碎片离子的元素组成和准确质量,同时给出了校正离子质量误差和谱图准确度(校正后质谱图与理论质谱图的相似度),10 个碎片离子的质量误差均小于 3mDa,谱图准确度均高于 99.1%;谱图准确度高于 99.0%表明校正离子信号与误差的比率高于 100:1,说明校正离子的

信号不存在显著饱和现象且无显著的杂质干扰,信号与噪音的比率远高于 100:1。

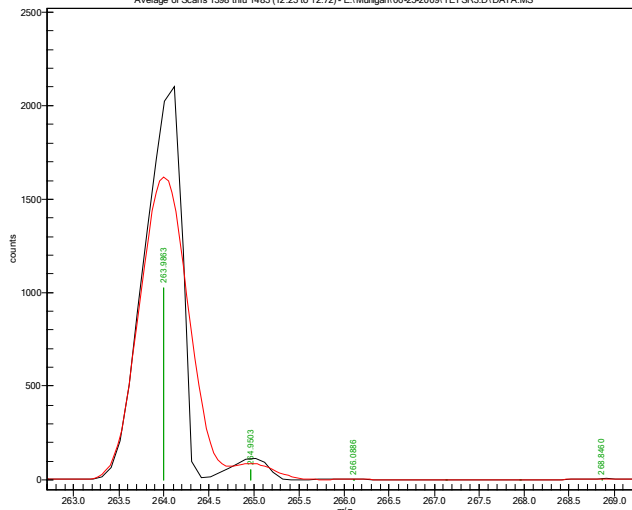
用建立的校正函数对保留时间 8.7min 的未知峰进行校正,按图 5 中设定的条件对质谱图中质量数最大的离子 240 用 CLIPS 进行检索,C₄H₈N₄O₄S₂ 化学式的理论质谱图与未知物离子的校正质谱图几乎完全匹配,具有最高谱图准确度 98.7%而排在全部 147 个待选化学式的第一位(图 6)。后续的盲样测试结果,验证了 C₄H₈N₄O₄S₂ 即为未知物(高毒性的灭鼠剂毒鼠强)的分子式。

Review Report - E:\Mulligan\06-25-2009\TETSR3.D\PTFA Calibration 2.mw.c 10/21/2009 11:02:07 PM

Calibration Information

Calibrated at: 10/21/2009 11:01:24 PM
Calibration type: Unknown
FWHM Gaussian: 0.46
FWHM Boxcar: 0.51

Average of Scans 1398 thru 1483 (12.23 to 12.72) - E:\Mulligan\06-25-2009\TETSR3.D\DATA.MS



	RT Window	Name	Net Formula	Mono Mass	Closest Centroid	?M (mDa)	?M (ppm)	Spectral Accuracy	RMSE
1	0 Scans 1398-1483		CF3	68.9952	68.9947	-0.4725	-6.8	99.4	20.00
2	0 Scans 1398-1483		C2F4	99.9936	99.9926	-0.9929	-9.9	99.6	2.34
3	0 Scans 1398-1483		C2F4N	113.9967	113.9941	-2.6374	-23.1	99.3	1.45
4	0 Scans 1398-1483		C2F5	118.9920	118.9957	3.7177	31.2	99.4	2.86
5	0 Scans 1398-1483		C3F5	130.9920	130.9936	1.6177	12.3	99.5	10.67
6	0 Scans 1398-1483		C3F7	168.9888	168.9873	-1.5071	-8.9	99.2	0.71
7	0 Scans 1398-1483		C4F7	218.9856	218.9872	1.5862	7.3	99.4	10.20
8	0 Scans 1398-1483		C5F10N	263.9871	263.9893	0.8469	3.2	99.2	3.74
9	0 Scans 1398-1483		C8F16N	413.9775	413.9770	-0.5462	-1.3	99.1	1.51
10	0 Scans 1398-1483		C9F20N	501.9711	501.9700	-1.1076	-2.2	99.1	1.16

图 4 PFTBA 的校正结果

CLIPS Parameters

Accurate mass to search: Show All Results

Charge: Show Top Results

Formula Generation by Mass

Mass Tolerance: mDa PPM

Electron State: Odd Even Both

Double Bond Equivalent Range: Min Max

Formula Determination by Spectral Accuracy

Profile Mass Range (Da): Start End Mixture Search

Interference Rejection: Formula 2:

Formula 3:

Show this dialog before each search

图 5 CLIPS 检索条件

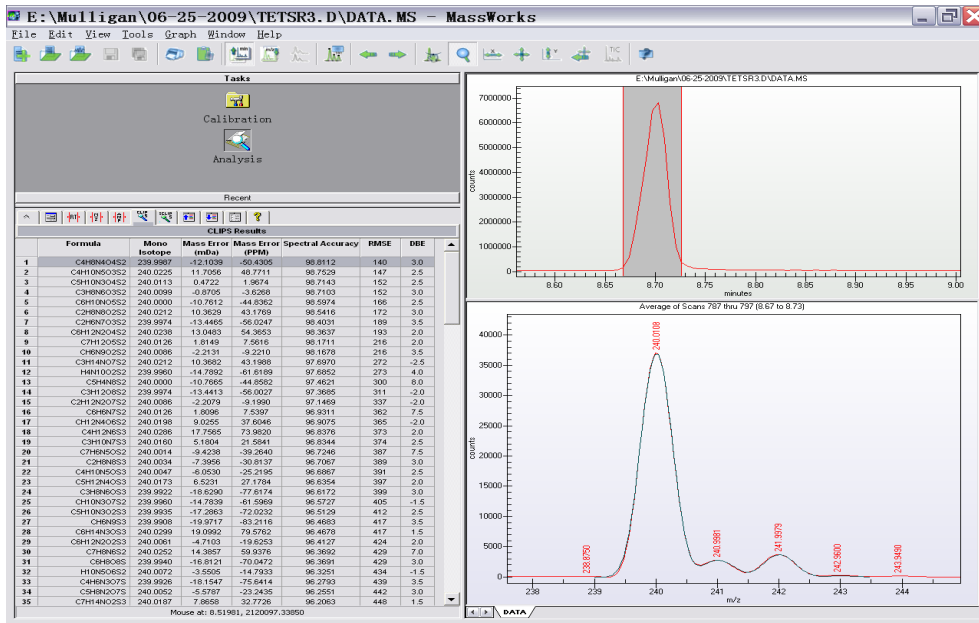


图 6 毒鼠强准确质量和分子式识别结果

同理, MassWorks™软件可以精准测定未知物碎片的化学式。如毒鼠强质量数为 212 的碎片, 采用 CLIPs 检索碎片离子的化学式 C3H6N3O4S2+ 因其具有最高谱图准确度 98.8% 而排在全部 102 个待选化学式的第一位 (图 7)。尽管排在第 2 和

3 位的待选化学式 C3H8N4O3S2 和 C2H8N6O2S2, 谱图准确度仅弱低于 C3H6N3O4S2, 但按常理化合物中每含 1 个 S, 一般需含 2 个 O 的规律, 就很容易将这两个待选化学式排除。

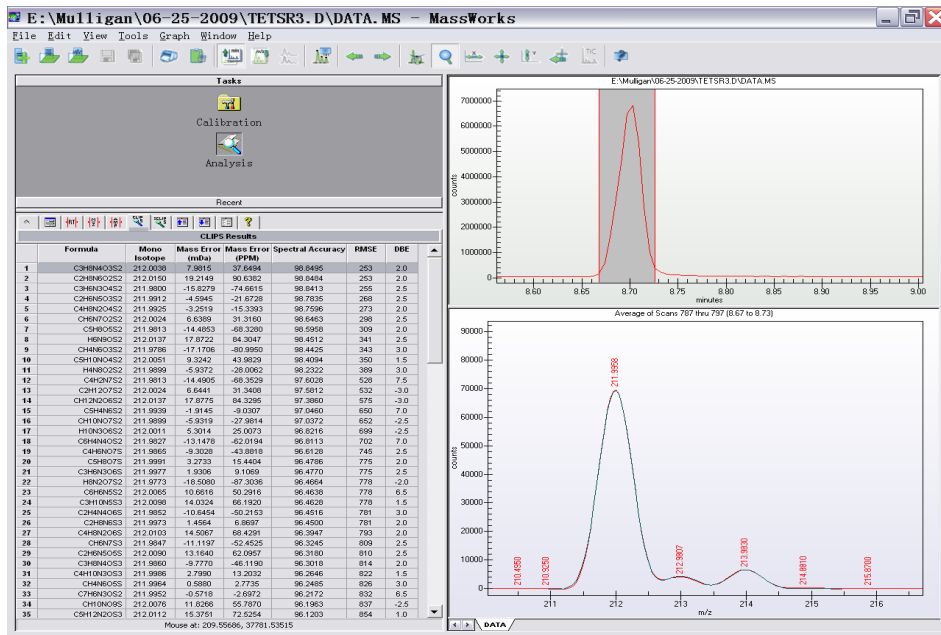


图 7 毒鼠强碎片离子 212 Da 准确质量和分子式识别结果

3 结论

本文以毒鼠强为例阐述了在低分辨气质联用仪 (GC/MS) 上运用 MassWorks™ 软件独特的质量校正和峰形校正技术测定未知物准确质量和分子式的过程。尽管 MassWorks™ 测定的准确质量数并不是每个离子均小于 5ppm, 但软件综合利用准确质量和谱图准确度两项指标可以实现分子式的准确识别。无论 NIST 谱库中是否含有, MassWorks™ 在低分辨 GC/MS 上均可对这些未知物进行准确质量测定和分子式识别。

文献

1. Wang Y, Prest H. *Chromatography*, **2006**, 27(3), 135.
2. Gu M, Wang Y, Zhao X, Gu Z, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 764–770
3. Wang Y, Gu M. *Spectroscopy (MS Supplement)*, May, 2008.
4. Sparkman O. D.; Jones P. R., Curtis M, *LCGC*, May, 2009.
5. Erve J. C. L.; Gu, M.; Wang, Y.; DeMiao, W.; Talaat, R. E., *JASMS*, **2009**, 20(11), 2058.

Identification Tetramine' Formulas by MassWorks Combination of Unit-resolved Mass Spectrometry

Li Weijian, Gong Junjie, Ouyang Weimin(Lumiere Tech Ltd ,Beijing 100080)

Abstract: This application example demonstrates that the comprehensive mass spectral calibration involving both mass and peak shape enables formula determination on the GC/MSD system. The MassWorks™ calibration can be conveniently established using the on-board PFTBA tune standard through infusion measurement within the same GC/MS data acquisition. While the mass accuracy achievable on the system may not be the industry standard 5ppm for all ions at different m/z values, the combination of mass accuracy and Spectral Accuracy can indeed achieve formula determination on a real chromatographic time scale. Not only can this formula ID capability be applied to unknown identifications where there is no available library spectrum to compare with through conventional library search, it can also be utilized as an independent confirmation of library search results through formula ID of either the molecular ion or its fragment ions.

Key words: MassWorks™, accurate mass, mass spectral calibration ,Formula determination, unit mass resolution.

MassWorks™ 分子式识别技术在质谱中应用

李卫建¹ 袁有荣¹ 欧阳伟民¹ 周 围²

(1.绿绵科技有限公司 北京 100080)

(2.甘肃出入境检验检疫局技术中心 兰州 730020)

摘 要 MassWorks™ 作为一种新颖的质谱校正技术,可以在低分辨质谱上测定精确质量并准确识别目标物的分子式,让低分辨质谱具有高分辨的功能,大大提高低分辨质谱的定性能力;对于高分辨质谱,MassWorks™ 的同位素峰形自我校正功能大大提高高分辨质谱分子式识别的能力。本文就 MassWorks™ 的原理及其在各类质谱的应用进行综述。

关键词 MassWorks 精确质量 分子式识别 气质联用 液质联用

利用质谱测定目标物的元素组成(分子式),对未知物进行定性,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。要测定元素组成,传统观念认为,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。而常规低分辨的质谱仪(如四极杆质谱),质荷比测定仅仅只能准确到 0.1-0.5 Da,常规方法难以准确测定目标物尤其是未知物的元素组成,从而极大的限制低分辨质谱的定性能力。

MassWorks™ 作为一种新颖的质谱校正技术,在低分辨质谱和高分辨质谱两者之间架起桥梁,利用精确质量数测定和线性同位素峰形校正专利技术,让低分辨质谱真正实现高分辨的功能,在低分辨质谱上进行精确质量数测定,精度可达 5ppm,并且对候选化合物进行线性同位素峰形校正检索,确定最为可能的唯一化合物分子式,极大地拓展低分辨质谱的定性功能;同时针对高分辨质谱,目标物正确的分子式往往不是质量误差最小的候选分子式,应用 MassWorks™ 的同位素峰形自我校正专利技术,可以在原有待选分子式基础上排除 99% 的假阳性分子式,真正实现目标物分子式的准确识别^[1]。

1 原理

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。MassWorks™ 软件专利的 MS Integrity™ 技术是一种新颖独特的技术,通过这种全新的质谱校正方法,不仅对质量轴进行校正,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在低分辨的质谱上获得精确质量数。

2 MassWorks 在气相色谱质谱联用中的应用

GC/MS 技术在食品安全、香精香料和环境等领域中得到广泛应用,该技术利用保留时间和 NIST 库谱图检索对目标物进行定性。谱库检索的匹配率与目标物的色谱分离情况密切相关,当色谱分离效果不佳,或目标物受到基质干扰等时,往往会出现匹配率不高,或几个待选物的匹配率相似等情况,此时,通过谱库检索定性就会产生很大的不确定性。MassWorks™ 利用其精确质量数测定和线性同位素峰形校正技术,可以在 GC/MS 测定目标物的精确质量和分子式,从而大大提高 GC/MS 的定性能力。

2.1 MassWorks™ 在香精香料成分鉴定中的应用

随着分析仪器的迅速发展,天然产物和香精香料的香气成分的分析水平得到很大的发展,目前,

采用 GC/MS 检测, NIST 谱库检索可以定性检测大部分成分。然而由于香精香料成分复杂, 如植物精油, 由于难以得到全部纯度较高的标准品, 尽管采用毛细管柱分离, 对于那些含量较低且又未得到彻底分的微量成分, 仅利用 NIST 谱库, 我们将难以对之进行准确定性, 而往往这些微量成分正是我们需要检测的有效成分或毒害成分。刘扬岷等^[2]采用 GC/MS 分析白兰花的香气成分, 共分离出 114 个色谱峰, 而采用 NIST 谱库仅鉴定 75 个成分。

利用 MassWorksTM 的精确质量数和线性同位素峰形校正功能, 可以测定每个色谱峰的所有离子的精确质量, 并对每一个离子的分子式进行准确识别, 将大大提高从复杂样品中鉴定出香气成分的个数。对那些具有相似结构的香气成分, 往往具有相似的匹配率, 从而导致我们难以判断, MassWorksTM 通过对分子离子峰分子式的准确识别, 可以准确鉴定这些成分。甘肃出入境检验检疫局技术中心周围等在分析中国苦水玫瑰精油中的复杂天然产物时, 采用 MassWorksTM 在香茅醇 (占全部峰面积的 99% 以上) 保留时间段, 鉴定出橙花醇和柠檬醛; 对于用 NIST 难以区分的长链脂肪烃, MassWorksTM 通过对其分子离子峰分子式的准确识别, 实现准确鉴定。

2.2 MassWorksTM 对环境中挥发性有机污染物的快速确认

GC/MS 是快速识别挥发和半挥发环境污染物的常用工具, 标准 EPA 方法能够识别超过 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, 在背景比较复杂和对那些不能用 EPA 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。错误识别对于突发事件中先遣急救员和执法者, 可能导致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进行分子式确证。采用 MassWorksTM 可以在 GC/MS 测定精确质量数并识别目标物分子式, 得到的结果与高分辨质谱具有很好的可比性。美国康涅狄格环境保护局^[3]用 MassWorksTM 软件在 GC/MS 上对分别对 73 种标准化合物 (EPA 方法表征) 和 17 种非标准化合物测定, 90 个化合物的质量误差均小于 20 mDa, 采用同位素峰形校正检索, 81 个位于待选分子式的第 1 位, 5 个位于第 2 位, 仅有 4 个位于

3~5 位, 从而进一步提高低分辨 GC/MS 对环境中挥发性有机污染物的快速确认能力。

2.3 MassWorksTM 在食品安全残留检测中的应用

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。为准确定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定性。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, 极大的限制其在常规实验室的普遍使用。MassWorksTM 软件的出现, 可以在单四极杆 GC/MS 上直接测定精确质量数, 并识别目标物的分子式, 作为一种全新的质谱技术, 极大的提高 GC/MS 在食品安全残留检测中对农兽药的定性确证能力。王亚男^[4]等运用 MassWorksTM 在 GC/MS 上测定农药的精确质量和分子式, 3 种农药精确质量的误差均小于 10 mDa, 采用线性同位素峰形校正检索, 3 种农药及其碎片的分子式均位于待选分子式的第 1 位; 由于莠灭净和西草净具有相似的分子量和理化性质, 色谱未能有效分离为共流出物, 采用 NIST 谱库检索很难确认目标物, 而 MassWorksTM 却能准确测定目标物的精确质量并准确识别目标物分子式, 具有较强的抗干扰能力, 从而可以大大提高 GC/MS 在食品安全检测中农兽药定性确证的能力。

3 MassWorksTM 在液相色谱质谱联用中的应用

3.1 MassWorksTM 在未知物的精确质量数测定中的应用

多数药物为小分子有机化合物, 测量化合物精确质量可推测其分子式组成, 进一步确定该化合物的不饱和度, 因而精确分子量测定是药物定性分析的重要技术。目前可以用于精确分子量测量的仪器有扇形场 (magnetic sector field) 质谱仪、傅立叶变换 - 离子回旋共振 (FT-ICR) 质谱仪、飞行时间 (TOF) 质谱仪和 Orbitrap 质谱仪^[5,6], 但是这些高分辨质谱仪昂贵的采购成本和使用成本, 使精确分子量测量和应用受到限制。MassWorksTM 软件的出

现, 可以在低分辨质谱上测定未知物的精确质量, 从而极大的扩展低分辨液质的功能。中科院上海药物所刘可等用 TSQ Quantum Ultra 型液相色谱串联质谱联用仪采集 20 种药物一级全扫描 profile 质谱图后, 利用 MassWorks 软件对质谱图进行校正后, 实现在 LC/MS 上测定 20 种药物分子 (分子量 135~810 Da 之间) 的精确质量测定, 其中 60% 的药物测量结果误差在 ± 5 ppm 以内, 90% 的药物测量结果误差在 ± 10 ppm 以内^[7]。

3.2 MassWorks™ 在药物和合成产物中微量杂质成分鉴定中的应用

无论是天然产物、还是合成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, 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, 实现准确鉴定药物中杂质的组成, 不仅降低杂质鉴定的难度, 而且大大节约测量成本。顾鸣等人用 UPLC 串接单四级杆质谱采集数据后, 用 MassWorks™ 对数据进行处理, 通过质量精度和谱图准确度, 准确鉴定辛伐他汀药物中所有杂质的组成。图 1 是样品的总离子流图, 由于采用 UPLC 进行分离, 全部成分在 9min 之内全部出完, 4.4min 的主峰即辛伐他汀, 其前后的小峰为杂质峰。表 1 是 MassWorks™ 测定杂质分子式的结果, 除保留时间为 4.0min 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, 从而实现辛伐他汀药物中所有杂质分子式的准确识别。

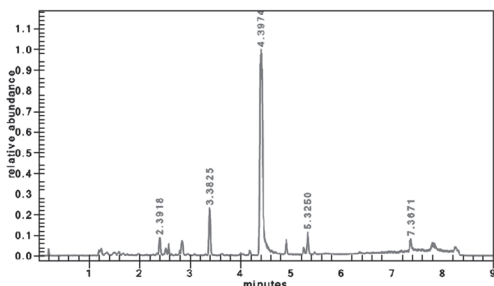


图 1 辛伐他汀药物总离子流图

表 1 MassWorks 测定的杂质分子式结果

化学式	质量 Da	误差 mDa	谱图 准确度	保留 时间	排序	待选 个数
C ₂₅ H ₄₄ NO ₅	438.3219	4.4	98.4	4.88	1	34
C ₂₅ H ₄₀ NO ₄	418.2957	5.7	99.1	5.33	1	28
C ₂₅ H ₄₁ O ₆	437.2903	1.8	99.4	3.38	1	49
C ₂₄ H ₄₀ NO ₅	422.2906	8.3	94.5	4.04	4	34
C ₂₄ H ₄₀ NO ₅	422.2906	7.1	98.1	3.95	3	32
C ₂₆ H ₄₄ NO ₅	450.3219	-0.4	97.3	5.24	1	33
C ₂₅ H ₄₀ NO ₅	434.2906	-1.4	97.2	4.18	2	36

3.3 MassWorks 在食品和药品中非法添加物快速筛查中的应用

食品或药品中的非法添加物, 可以使人致伤、致残乃至致死亡, 会给社会及消费者带来极其严重的危害, 典型的案例如“梅花 K (黄栌胶囊) 假药案^[8]。食品和药品中的非法添加物的种类和数量繁多, 现有的国家标准只能分别检查单个或某一类非法添加物, 且定性检查效率不高, 给检验分析人员分析检测增加一定的难度。目前食品药品监督部门急需建立快速、灵敏、准确的检测违法添加成分, 并且能够前瞻性地定性未知成分的检测技术^[9]。张喆等以某保健食品中添加的壮阳类化学品为例, 用 LC/MS 采集样品的全扫描数据, 然后采用 MassWorks™ 的精确质量过滤功能^[10]对样品中的可能的非法添加物进行筛查, 对筛查出的阳性样品, 再用 MassWorks™ 的峰形校正和线性峰形同位素峰形检索功能测定目标峰的精确质量数和分子式, 进一步确证, 从而建立一种快速、灵敏、准确的快速筛查药品中非法添加化学品的新技术, 可为食品和质量检查工作提供可靠的技术保障。图 2 是来自市场的两种中药保健品中壮阳化学品 (他达那非 C₂₂H₂₀N₃O₄、西地那非 C₂₂H₃₁N₆O₄、伐地那非 C₂₄H₃₂N₆O₄S) 的 MassWorks™ 精确质量筛选结果, 样品 1 中筛查出添加西地那非, 样品 2 中未添加任何壮阳化学品。

4 MassWorks 在高分辨质谱中的应用

随着质谱硬件技术的向前发展, 质谱的分辨率不断提高, 其测定化合物分子量的精度不断提高, 如在飞行时间质谱 (TOF) 上, 质量精度可达为 5ppm 以下, 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 800000 : 1, 通过它可以得到 < 200ppb 的质量精度。高的质量准确度和质量精度对我们定性识别未知化合物具有非常大的帮助, 但随着化合物分子量的增大和元素

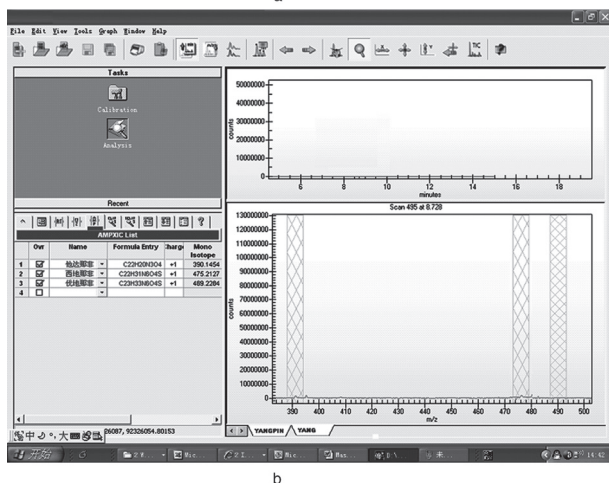
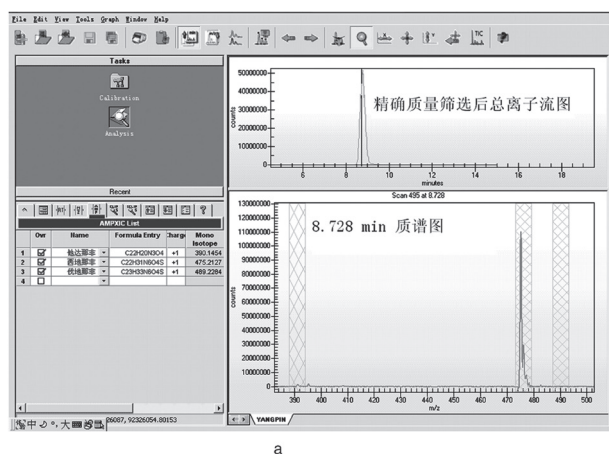


图2 2种壮阳化学品的精确质量筛选结果
a. 样品1; b. 样品2

组成的复杂程度的加大,大量的待选分子式增加我们准确识别目标物的难度。Kind等在用高分辨质谱进行代谢组学研究时发现,对成分复杂的代谢产物,即使质量误差小于1ppm,仍将有许多待选分子式无法排除。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。Kind的研究表明,采用目标离子质心图同位素丰度匹配,可以排除掉待选分子式中95%的假阳性分子^[11,12]。

对于那些同位素丰度比差异较小,且当质谱图受到噪音等信号干扰时,高分辨质谱软件中质心图的同位素丰度匹配将难以区分这些分子式。MassWorks软件中的sCLIPS功能,在匹配检索之前,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,可以排除掉99%以上的假阳性分子式,实现目标物的准确识别。John等在用LTQ/Orbitrap测定并识别10种分子量大于600 Da药物分子的元素组成时^[13],不同分辨率下,LTQ/Orbitrap测定10种药物分子的质量误差均小于2 ppm;在允许质量误差2 ppm范围内,

可能包含的元素条件(C₀₋₁₀₀H₀₋₂₀₀N₀₋₅₀O₀₋₅₀Cl₀₋₅S₀₋₅)对目标物的分子式进行识别,以质量误差排序大部分目标物位于待选分子式的第10~100之间,而以MassWorks™的谱图准确度排序目标物位于待选分子式的第1~8之间,且80%处于前3位,结果表明在用高分辨率质谱测定并识别未知物的分子式时,MassWorks™软件的sCLIP可以用来排除99%以上的假阳性分子式,真正实现未知物分子式的准确识别。

5 结论

MassWorks™作为一种新颖的质谱校正技术,真正实现在低分辨质谱上测定精确质量并准确识别目标物的分子式,让低分辨质谱具有高分辨的功能,大大提高低分辨质谱的定性能力;对于高分辨质谱,MassWorks™的同位素峰形自我校正功能大大提高高分辨质谱分子式识别的能力。随着MassWorks™应用技术的不断提高,引入新的功能如对候选分子式中自然界不存在化合物的筛除,将大大提高分子式识别的准确性,同时,对现有实验室质谱使用状态好坏的评估能力,以确保实验数据的可靠性,也将为质谱工作者带来新的评估手段。邢志等^[14]将MassWorks™应用扩展到低分辨ICP-MS在干扰物存在下准确定量目标离子,在无机质谱的应用上开辟新的领域。

参考文献

- 1 Yongdong Wang, Harry Prest. Accurate Mass Measurement on Real Chromatographic Time Scale with a Single Quadrupole Mass Spectrometer[J] Chromatography, 2006, 27(3)
- 2 刘扬岷,王利平,袁身淑等.固相微萃取气质联用仪分析白兰花的香气成分[J],无锡轻工业大学学报,2001,20(4): 427~429
- 3 Jianping Chen, Ming Gu, Yongdong Wang, Don Kuehl. Improving the Confidence of Unknown Compound Identification by First Responder Mobile GC-MS Laboratories in Time-Critical Environmental and Homeland Security Incidents[J]. 2008, 26(9): 938~945
- 4 王亚男,汪聪慧,李卫建.农药残留分析中准确定性新技术-Massworks[J],中国农业科技导报,2009, 11 (S1): 39~42
- 5 McLuckey SA, Wells JM. Mass analysis at the advent of the 21 st century [J]. Chem Rev, 2001, 101: 571~606
- 6 Ma SG, Chowdhury SK, Alton KB. Application of mass spectrometry for metabolite identification [J]. Curr Drug Metab, 2006, 7: 503~523

- 7 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
- 8 LIU Y f, LI J, XIE Y c, et al. Recent advances and analytic technique on determination of chemical drug mixed illegally in TCPM[J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2008, 22(12): 1067
- 9 高青, 车宝泉, 张喆等. LC-MS/MS 法检查中药制剂及保健食品种非法添加的 16 种镇静催眠药物 [J], 中国药科大学学报, 2008, 39(2): 142~146
- 10 Ming Gu, Yongdong Wang, Xianguo Zhao, Zheming Gu. Accurate mass filtering of ion chromatograms for metabolite identification using a unit mass resolution liquid chromatography/mass spectrometry system[J]. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2006, 20: 764~770
- 11 Kind, T, Fiehn, O. Metabolomic Database Annotations via Query of Elemental Compositions: Mass Accuracy is Insufficient Even at Less Than 1 ppm. BMC Bioinformatics 2006, 7
- 12 Kind, T, Fiehn, O. Seven Golden Rules for Heuristic Filtering of Molecular Formulas Obtained by Accurate Mass Spectrometry. BMC Bioinformatics 2007,
- 13 John C. L. Erve, a Ming Gu, Spectral Accuracy of Molecular Ions in an LTQ/Orbitrap Mass Spectrometer and Implications for Elemental Composition Determination[J]. J Am Soc Mass Spectrom 2009, 20, 2058~2069
- 14 Xing Zhi, Ming Gu, and Yongdong Wang, Deconvolution of Isobaric Interference in ICP-MS by Peak Shape Calibration Technology. 2010 ASMS poster

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, 单四极质谱仪(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

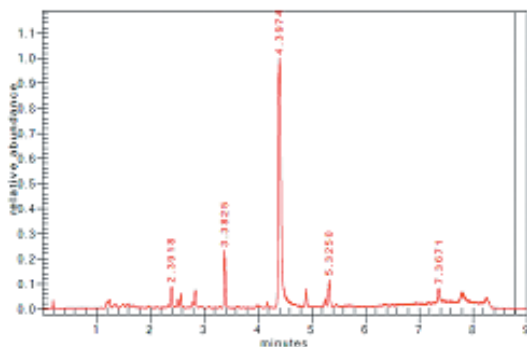


图1辛伐他汀药物总离子流图

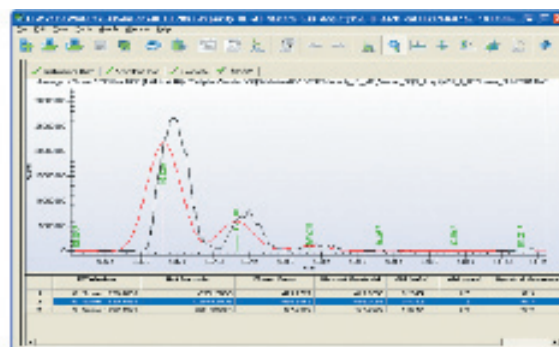


图2辛伐他汀离子校正结果

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

未知物鉴定：1ppm 不够，谱图准确度帮大忙

分析测试百科网访谈稿: <http://www.antpedia.com/html/90/n-106690.html>

——访 MassWorks 软件发明人思路生科公司总裁王永东博士

【导语】美国分析化学 (Anal. Chem.) 期刊封面, 在 9 月号刚发表了题为 “The Concept of Spectral Accuracy for Mass Spectrometry” 的文章, 这本有着分析化学风向标美誉的期刊, 第一次在学术上公开表示了对 “质谱谱图准确度” 的认可。最近, 我们有幸通过越洋电话, 采访到此概念的发明人王永东博士和他的同事顾鸣博士, 他们将为我们展开介绍谱图准确度给每位质谱工作者带来的好处……

什么是 “质谱谱图准确度” ?

首先, 顾鸣博士为我们介绍了什么是 “质谱谱图准确度” (Spectral Accuracy for Mass Spectrometry)。

我们所讨论的质谱谱图就像紫外/可见光和傅里叶红外光谱一样是连续曲线, 它的纵轴是信号强度, 横轴是质荷比。但质谱与其它分析技术相比的不同之处是质谱的理论图谱可以非常准确地计算出来。所以我们可以很有效地比较理论图谱与试验谱图。简而言之, **谱图准确度的定义是试验谱图与理论谱图相比之下的差距。** 比如说, 试验测量的谱图与理论谱图 (在去掉关系试验谱图强度的常数后) 一模一样, 这个实际测量的质谱谱图准确度就是 100%。

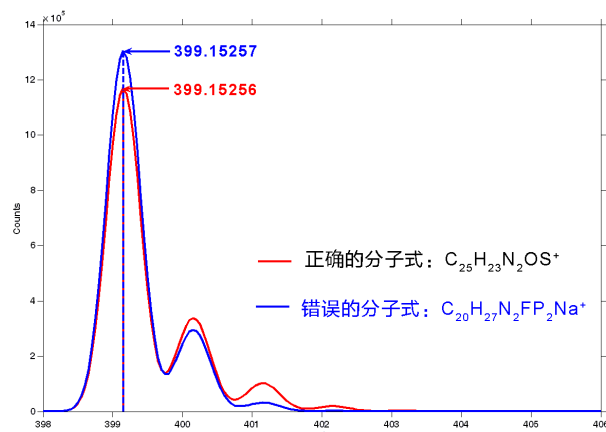
在此之前, 很多质谱工作者都了解 “质量准确度” (Mass Accuracy), 目前 TOF、Orbitrap、FT MS 等仪器都在强化人们的 “质量准确度” 意识, 比较公认的说法是: 当质量测定得足够准时, 可以直接获得化合物的化学式, 或者把候选物质的数目尽量减少, 帮助人们快速对化合物进行定性。

当笔者问道 “谱图准确度” 和 “质量准确度” 的区别时, 顾博士用一个比喻形象作答: “质量准确度是一维单点的测量; 而谱图准确度是二维多点的测量。打个比方说, 质量准确度是看见了树木没看见森林。”

说到这里, 顾博士举了一个例子。应用 CHONF 五种元素在质量准确度 1 ppm 的条件下搜索一个测出质荷比等于 823.4130 的未知物, 会得到共计 58 个不同的分子式 (事先我们知道其分子式是 $C_{43}H_{59}N_4O_{12}$)。仅仅根据质量准确度来鉴定这个未知物几近大海捞针、是完全不可能的。但有了谱图准确度的帮助, 未知化合物谱图可以与 58 个在 1 ppm 质量准确度范围内分子式的谱图进行一一比较, **正确的未知物分子式**

($C_{43}H_{59}N_4O_{12}$) 获得高达 99% 谱图准确度名列第一, 所以可以轻而易举地被确定。恰恰相反的是, 如根据质量准确度来鉴定, 正确的分子式仅排列第五; 排列第一到第四的分子式都是错误的。比如其中 $C_{35}H_{51}N_{12}O_2F_8$ 的质量准确度高达 0.02 ppm, 排在仅凭质量准确度搜索的第一位, 却因谱图准确度只有 95% 而排在依据谱图准确度搜索结果的第 13 位。此例充分说明, 没有谱图准确度, 仅依赖质量准确度去鉴定未知化合物不仅难度大、而且会导致错误的结果, 因为它 “只看见了单点质量准确度这一棵树”, 而 “没有看到谱图的整片森林”。

谱图准确度和质量准确度的区别:



图中红色是按照谱图准确度搜索谱图匹配最好的、正确的结果;

而蓝色是错误的分子式, 即使它的质量准确度非常高, 但谱图准确度却不高

“质谱谱图准确度” 为什么很重要?

王永东博士任总裁的思路生科 (Cerno Bioscience) 公司研发的 MassWorks 软件中, 集中应用了谱图准确度的专利技术。对于记者提出

的“谱图准确度为什么很重要？”的问题，王博士谈到了下列几点：

- (1) 由于质谱谱图上所有的点都用于谱图准确度的计算，所以它是更为完善和全面的指标。
- (2) 谱图准确度不仅有很大的学术价值，而且具有重要的实用价值。
- (3) 应用谱图准确度可以解决许多先前难以想象的问题。
- (4) 谱图准确度既适合低分辨又适合高分辨质谱仪。所有质谱厂家仪器都可以应用谱图准确度来帮助确定未知物的分子式。

总结来说，MassWorks 软件可用于任何质谱的定性工作，特别适用于未知物的定性，而不论质谱图库中是否包含这个未知物。如果有质谱图库，这套软件可用作图库查找时完全独立的验证；如果没有质谱图库可查，则非用这套软件不可，不然在低分辨的质谱仪上没法定分子式，在高分辨的有精确质量的仪器上常会定错分子式而全然不知。

王博士还特别谈到：由于《分析化学》上的这篇专门介绍谱图准确度的文章发表，标志着学术界对谱图准确度概念的正式接受；过往的学术争论也因此结束。这对于希望以谱图准确度发表文章的用户来说，是个很好的消息。

“质谱谱图准确度”的用途和好处

谈到质谱谱图准确度的应用，王永东博士更是如数家珍地举了若干个代表性的应用：

- (1) 用低分辨四极杆质谱确定未知化合物元素组成：

用质谱确定分子式由来已久都是由傅里叶变换 (FT MS) 和时间飞行 (TOF) 这些高分辨仪器垄断；但这样的仪器购买维持的费用很高，操作也不简单。用低分辨四极杆质谱确定未知化合物元素组成曾经被认为是不可思议的；有了谱图准确度后，这样的分析正如一位用户所说的便成了“举手之劳。”

(2) 复杂质谱的分析：

无论是高分辨或低分辨质谱，不同离子的质谱峰会相互重叠。利用谱图准确度可以将这样重叠的质谱峰以数学的方法分开。这对石油化工中碳氢化合物或生化领域复杂质谱的分析具有十分重要的意义。

值得一提的是，对质谱图相互重叠的离子，MassWorks 已提供可在定性时同时进行定量的功能。

(3) 质谱仪问题的诊断：

谱图准确度完整地描述了质谱曲线上所有点的测量准确性，因此，如果质谱仪出了问题，谱图准确度可提供仪器诊断信息，帮助用户有所警觉。比如，检测器也许有线性范围的问题，或者质谱图上有干扰峰的出现。对于质谱仪的研发人员来说，谱图准确度还会给仪器工程师准确的反馈，从而设计和制造出具有最好质量准确度和谱图准确度的下一代仪器。

具体到谱图准确度为中国用户提供的好处王博士还特别强调了几点内容：

中国有很多现有或即将购买四极杆质谱（如四极杆气质联用仪、串联四极杆气质联用仪、四极杆液质联用仪、串联四极杆液质联用仪）的用户。在这种仪器上应用谱图准确度来确定分子式是经济实惠切实可行的途径。因为它投入少，维护容易，对操作人员要求不高。

MassWorks 是个极其环保的绿色产品；对于很多需要更多了解质谱原理的科技人员来说，MassWorks 还是质谱教学/教育的好工具。

中国在食品安全、环境安全、生物医药研发外包 (CRO)、中药/天然产物鉴定等方面有全球特色的应用，这些应用都涉及未知物的鉴定，因此 MassWorks 软件是不可或缺的有力工具，不论是对低分辨还是高分辨质谱用户。

“我们在向世界各地推广的过程中发现，工业愈发达的地方，对分析的要求愈高愈仔细，用户对 MassWorks 的认可愈高。举例来说，我们在海外有不少酒业方面的用户；中国是个很大的酒业生产和消费国，MassWorks 软件对这些酒业用户将会提供强有力的帮助，帮助它们更好地鉴别和区分各种层次、各种级别的产品。”

王博士还特别指出，MassWorks 产品兼容于全球所有的各大质谱厂商，而且操作简便、容易：“它是一套专门用来后处理质谱数据的定分子式的软件，不需要控制质谱仪；由在分析界极富经验的软件开发人员设计制作，所以对分析人员来说，它的应用和操作非常简单。”

刚才王博士曾提到“MassWorks 软件是不可或缺的有力工具，不论是对低分辨还是高分辨质谱用户。”记者忍不住问道：“目前，全球和中国的很多客户都在购买 TOF 类、Orbitrap 类的高分辨率质谱，TOF、Orbitrap 上能用这套软件么？用了会有什么好处？”

王博士回答道：“我们现在有许多 TOF 和 Orbitrap 用户，他们的确需要谱图准确度来帮助他们进一步减少鉴定未知物时的假阳性。比如说

用这些仪器得到了 5ppm 质量准确度, 但检索分子式时往往还有一大堆(比如十个到几十个), 没有谱图准确度的帮忙是无法准确地鉴定未知物的。另外, 我们在软件的推广中遇到很多因为一味依靠高分辨仪器上的质量精确度而将分子式定错的例子(包括好些个 FTMS 的用户)。这种错误通常会给研究或企业的产品带来不可估量的损失。这些错误中的绝大部分都可通过 MassWorks 的谱图准确度来消除。”

“质谱谱图准确度”是如何诞生的?

接受访谈的王永东博士和顾鸣博士, 都是早期留美的华裔人士, 他们是思路生科公司(Cerno Bioscience)公司的创始人。关于他们为什么要发明“谱图准确度”, 首先要了解一下他们两位的“出身”和 Cerno Bioscience 公司的辉煌经历。



2006 年 Pittcon 获奖后的照片, 图中左二是顾鸣博士, 右二是王永东博士



2006 年 Pittcon 会议, MassWorks 获奖的奖牌

王永东: 获华盛顿州立大学化学系分析化学专业博士。专攻化学计量学在分析化学中特别是光谱中的应用。毕业后就业于 PerkinElmer 公司从事仪器开发和应用的研究, 后升任科学技术部主任并获取哥伦比亚大学商学院企管硕士。

顾鸣: 获华盛顿州立大学化学系分析化学专业博士。专攻质谱仪器的设计和应用。毕业后在该校分子生物系从事三年蛋白组学的博士后研究。之后就业于惠氏和施贵宝制药公司开发应用于药物代谢以及大分子药物的质谱分析方法。

两人于 2003 年在美国康州创建了思路生科公司(Cerno Bioscience)公司, 王、顾两人分别任总裁和技术总监。思路生科公司拥有 12 个全球范围内的质谱专利和独具一格的质谱数据处理软件 MassWorks。MassWorks 自 2006 年投放市场, 即荣获当年匹兹堡最富有创新产品的铜质奖章, 备受所有质谱厂家和质谱工作者的广泛关注。该产品不仅在质谱技术上获得标志性突破; 而且能直接给质谱终端用户带来前所未有的功能。MassWorks 自发明以来, 行销全球各地(包括中国)众多的行业, 已成为质谱工作者鉴定未知化合物必不可少的工具。

关于为什么要研发 MassWorks 软件和谱图准确度, 王博士表达了科学工作者对于技术创新的酷爱之情: 与其说是以营利为宗旨, 不如说是填补了一项质谱技术的空白, 并将它开发成具有实用价值的产品。这起码有三个方面可以说明:

第 1、在质谱行业长期以来一味追求高质量准确度, 从而忽视了同位素分布这一非常重要的信息。通过这个产品我们引进了谱图精确度的概念。事实上数不胜数的例子, 会使更多的质谱科技人员认识到谱图准确度的重要意义。

第 2、谱图准确度是用连续质谱图(Profile)来计算的。与以往用棒棒图(Centroid)来比较同位素分布, 其效果会有天壤之别。

第 3、理论上计算的质谱图是离散性的, 而质谱仪上观察到的是连续曲线, 其间有荷质比的位移(质量误差), 更重要的是带有质谱仪特征的峰型函数。将理论质谱图与实验质谱进行精确的比较是我们发明这套技术的直接推动力。

“我们在软件的推广中遇到很多因为一味依靠质量精确度而将分子式定错的例子。这种错误通常会给研究或企业的产品带来不可估量的损失。这些错误中的绝大部分都可通过 MassWorks 的

谱图准确度来消除。这让我们感到很高兴、很有成就感！”

在产品的全球推广中，专利是非常重要的。据顾鸣博士介绍，MassWorks 软件是具有 **12 个世界范围专利保护** 的独特产品。“我们至今还没有发现有同类产品能够与我们竞争，这是因为我们有独一无二的质谱标定技术。简单来说，通常的质谱只做质荷比的标定，而我们的标定既校正质荷比、又校正质谱的峰型。这也是我们能应用最简单的四极杆来做未知化合物分子式确定的关键所在。由于我们的技术受到世界各国的专利保护，为我们的产品确立了一个独一无二的位置，也使得产品可以获得全球范围的广泛应用，获得全球各行业用户的广泛反馈。值得一提的是，我们的第一个专利最近已获中国专利局的批准。”

“质谱谱图准确度”和 MassWorks 业已取得的成绩

据了解，MassWorks 软件已行销西欧、北欧、北美、亚洲的众多国家。全球几乎所有大型制药公司都是 MassWorks 的用户。其他的客户分布于石油化工、香精香料、环境保护、安全检测，药品检验，食品安全行业等等不胜枚举。

“我们帮助客户解决的最常见问题是——未知化合物分子式确定。我们正与许多大公司协商互利的合作关系；特别是，我们与安捷伦共同开发 MassWorks 在其气质联用方面的应用已有相当长的一段时间。”顾鸣博士说。

MassWorks 软件自推出以来，获得了无数客户的好评。

TOF 用户评价：“祝贺你们，sCLIPS 再一次给我留下深深的印象。两次的盲样测试，你们鉴定的分子式的第一选择都是正确的结果。此外，我发现对高分辨质谱数据，你们竟然不需要利用标准化合物进行标定，仅仅利用同位素的信号就可以做分子式的鉴定。这简直是太神奇了。”——这是西瓦克教授在两次盲样测试（Leco LC-TOF）得到正确结果后的感受。

四极杆 GCMS 用户评价：“自从 2007 年夏季我就测试和使用 MassWorks 这个软件。我

的主要目的是应用这个软件鉴定分子式的性能去进一步核实气质未知化合物 NIST 谱库检索的结果。尤其是当检索结果显示多种化合物具有相似匹配值时，MassWorks 会提供另一个独立的分子式帮助确定未知化合物。相对来说，这个软件简单易用。在我所测试的各种类型多于二百的化合物中，大部分由 MassWorks 分析结果都将正确的分子式排在第一位。”——美国一州政府环保实验室用户

三重四极杆液质联用用户评价：“使用 MassWorks 非常简单，一学就会。我仅仅花了几分钟的时间就得到了第一次振奋人心的结果。我们在使用了十年有余的三重四极杆上，通常可以达到 10 ppm 或者更好的质量准确度。这个软件已成为我们鉴定合成化合物的重要组成部分。”

更多评价，请见分析测试百科网上的 MassWorks 专题：

<http://www.antpedia.com/special/massworks.html>

对于四极杆、飞行时间（TOF）、Orbitrap 等质谱，MassWorks 和其谱图准确度已经证明了其强大威力，但对于离子阱质谱是不是有可能用 MassWorks 呢？针对记者的疑问，王博士回答说：“离子阱类仪器有空间电荷效应，通常得不到四极杆仪器所得到的效果。但其中，线性离子阱的空间电荷效应似乎并不太严重。我们有不少在线性离子阱鉴定分子式方面的成功例子。最近我们发现，有某大质谱仪厂家希望利用 MassWorks 中的谱图准确度，来帮助他们测定离子阱类仪器空间电荷效应的大小，以进一步改善离子阱的功能。我们相信在不远的将来，由于谱图准确度所带来的反馈信息，离子阱在谱图匹配、定量、动态范围等方面的功能将会愈来愈接近四极杆仪器。”

MassWorks 软件在中国由北京绿绵科技有限公司独家代理，如您有兴趣获取更多信息，可致电：

010-82676061/2/3/4/5/6

或发邮件：info@lumtech.com.cn

原文发表于：

分析测试百科网 <http://www.antpedia.com/html/90/n-106690.html>