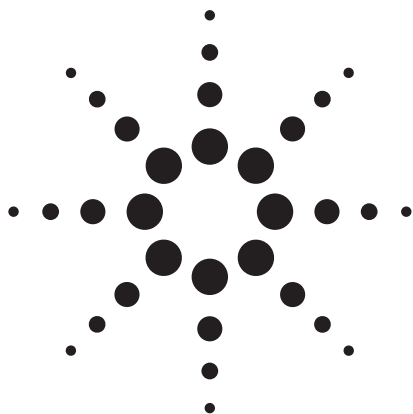
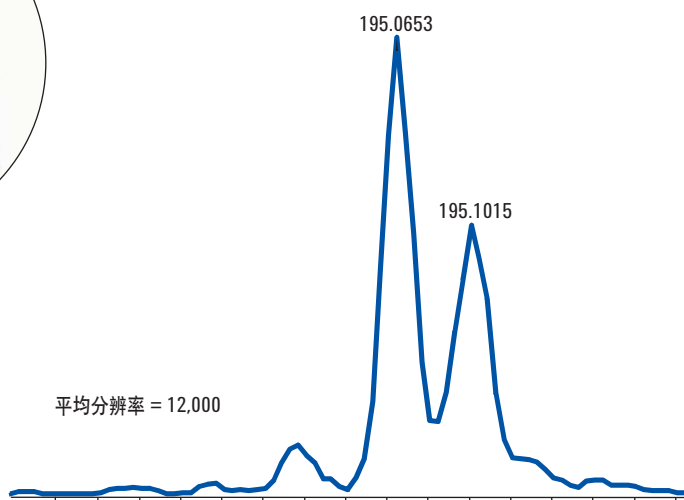




分辨率对复杂样品精确质量分析的影响

应用报告

Doug McIntyre
Pat Perkins
Edgar Nägele



摘要

本应用报告证明：

- Agilent 6520 精确质量四极杆-飞行时间(Q-TOF)液质联用仪(LC/MS)和 Agilent 6220 精确质量飞行时间 (TOF) 液质联用仪的性能
- Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 和 Agilent 6220 精确质量 TOF LC/MS 的动态范围和质量分辨率都得到了提高
- 这两种系统在质量分析和分子量计算方面具有很高的准确性
- 仪器性能的提高对样品检测结果的影响

Agilent 仪器

- 1200 系列快速高分离度液相色谱系统
- 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS
- 6220 精确质量 TOF LC/MS

应用领域

- 制药工业
- 法医分析
- 环境分析
- 食品分析



Agilent Technologies

引言

质谱仪中,分辨能力和动态范围与质量精度之间不存在直接关系。例如,当进行合成化合物的结构确证时,分辨能力达到 200,000 以上的傅立叶变换 (FT) 质谱仪,其质量精度一般仅比分辨率为 10,000 的飞行时间 (TOF) 质谱仪高出 2 倍。对于 Agilent TOF 和 Q-TOF,当分析纯化合物时,分辨率提高 2~3 倍,其质量精度并没有表现出明显改善。然而,当分析复杂的混合物时,结果却截然不同。本文通过研究证明,复杂混合物分析中当化合物的子离子质量数非常接近时(分离度<50 mDa),TOF 和 Q-TOF 分辨率和动态范围的提高将如何对质量精度产生影响。

实验部分

仪器

Agilent 1200 系列快速高分离度分离液相色谱系统包括:

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵和脱气机
- Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器(ALS SL),带恒温装置
- Agilent 1200 系列柱温箱(TCC)
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器(DAD SL)
- Agilent 6220 精确质量 TOF LC/MS 或 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS
- 色谱柱 1: Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 x 30 mm, 粒径 3.5 μm
- 色谱柱 2: Agilent ZORBAX SB-C18, 2.1 x 150 mm, 粒径 1.8 μm

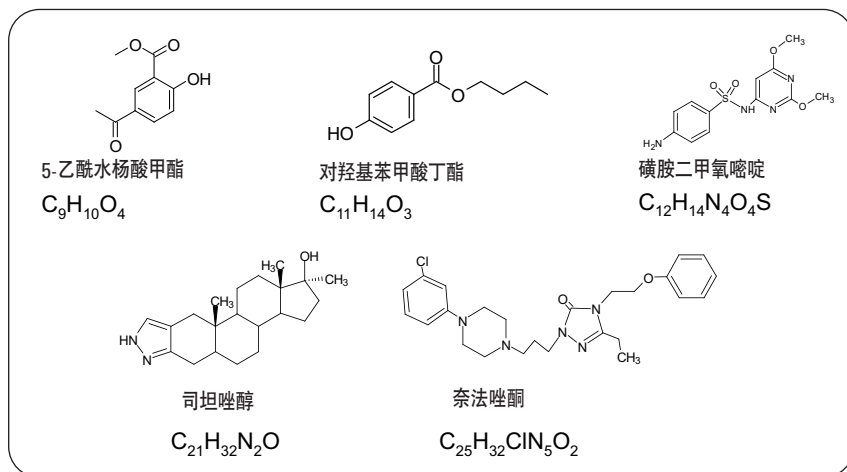


图1
待测化合物的结构和分子式

样品

待测化合物 5-乙酰水杨酸甲酯(MAS)、对羟基苯甲酸丁酯(BP)、磺胺二甲氧嘧啶和奈法唑酮均购自 Sigma- Aldrich,以甲醇溶解并制成浓度为 1 mg/mL 的贮备液。1 mg/mL 的司坦唑醇甲醇溶液购自 Alltech。所有溶液加水稀释至浓度为 10-30 ng/ μL 。制备了一系列奈法唑酮的稀释液,浓度范围为 2 ng/mL 到 100 $\mu\text{g/mL}$ 。(进样量为 1 μL 。)化合物结构见图 1。

LC TOF 条件

HPLC 分析条件:

- 溶剂 A: 含 0.1% 甲酸的水溶液
- 溶剂 B: 含 0.1% 甲酸的甲醇溶液
- 流速: 0.5 mL/min, 90%B 等度洗脱 1 min
- 柱温: 45 $^{\circ}\text{C}$

Agilent 6220 精确质量 TOF LC/MS 数据采集参数如下:

- 离子源: 电喷雾 (ESI) 正离子模式, 双喷雾器带参比标样校正

- 干燥气: 10 L/min, 300 $^{\circ}\text{C}$
- 雾化器压力: 45 psi
- 质量范围: 100~1000
- 扫描速率: 3 次/sec
- 碰撞诱导解离电压: 125 V
- 截取锥: 60 V
- 毛细管电压: 4000 V
- 仪器状态: 1700 m/z , 1、2、4 GHz

LC Q-TOF 条件

液相色谱仪运行条件如下:

- 溶剂 A: 含 0.1% 甲酸的水溶液
- 溶剂 B: 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液
- 流速: 0.5 mL/min
- 梯度 1: 使用色谱柱 1, 柱温 45 $^{\circ}\text{C}$, 4 分钟内溶剂 B 的比例由 20%升至 60% (该色谱条件用于司坦唑醇实验)
- 梯度 2: 使用色谱柱 2, 柱温 60 $^{\circ}\text{C}$, 15 分钟内溶剂 B 的比例由 5%升至 75% (该色谱条件用于鉴定奈法唑酮代谢产物)

Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 的采集参数如下：

- 离子源：电喷雾（ESI）正离子模式，双喷雾器带参比标样校正
- 干燥气：10 L/min, 300 °C
- 雾化器压力：45 psi
- 质量范围：80~1000（MS 和 MS/MS）
- 扫描速率：3 次/秒
- 碰撞诱导解离电压：200 V
- 截取锥：60 V
- 毛细管电压：4000 V
- 碰撞能量：35 V（磺胺二甲氧嘧啶）或 55 V（司坦唑醇）
- 在设定的 MS/MS 模式下运行时，分离宽度设为中（4 m/z ）
- 仪器状态：1700 m/z ，1、2、4 GHz

结果与讨论

仪器分辨率

TOF 质谱仪所表现的分辨率与以下因素都有关：质量分析器的实际分辨能力；检测器电路对信号的响应；以所需的速度检测输出信号的能力。与早期数字化输出速率 1 GHz 的型号相比，Agilent 6220 精确质量 TOF LC/MS 和 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 均使用反应更快的放大电路，并且检测器的数字化输出速率可以分别达到 1、2 或 4 GHz。这种新的信号处理方式已有介绍。[1]

这类质量分析器在数字化输出速率为 4 GHz 时， m/z 118 的分辨率通常能达到 10,000 以上， m/z 1522 的分辨率能达到 20000 以上。数字化输出速率对测得的分辨率的影响见表 1。

从表中可以明显看出，数字化输出速率为 1 GHz 时，在低 m/z 处数据的采样过疏，导致分辨率远低于仪器能力。1 GHz 的采样速率相当于每 1 纳秒采样 1 次，因此，对于 m/z 118 处峰宽为 1 纳秒的色谱峰，采样次数为 1。事实上，1 GHz 时，测得的 m/z 118 的分辨率约为 4000。

当分析纯化合物时，数字化速率由 1 GHz 变为 4 GHz 分辨率可提高 2~3 倍，但却不能明显改善质量精度。通常，对于分子量范围为 100~800 之间的化合物，质量精度为 1~2 ppm。在测定质量误差在 10 ppm 以上的样品时，显然有其他化合物中表面上看来质量数相等的

离子影响了检测。因此，分辨率的提高将改善复杂样品的质量分析精度，从而可以从 MS 和 MS/MS 数据中获得正确的分子式。

TOF 模式下的分辨率和精度

通过试验，比较了 TOF 模式下分别以 1 GHz 和 4 GHz 进行数字化时的质量误差。MAS 与 BP 的分子量相差 36 mDa。将两种化合物以 128:1~1:1 的各个比例混合，调流动相比例，使这两种化合物在色谱中不能得到分离。在 1 GHz 下，计算每个样品的质量误差，见表 2。

稀释液	质量误差 (ppm)
128:1	2.89
64:1	3.25
32:1	5.09
16:1	10.13
8:1	17.13
4:1	33.17
2:1	64.06
1:1	120.51

表 2
数字化速率为 1 GHz 时，MAS 的质量误差是 MAS/BP 比值的函数

m/z	到达时间 (nsec)	ΔM (mDa)	Δt (nsec)	1 GHz 下全 FWHM 的样品数	4 GHz 下全 FWHM 的样品数
118	20,000	12	1	1	4
1522	69,211	76	1.7	1.7	6.8

表 1
对于列举的 m/z 值，质量差、时间差以及样品数均为数模转换器（ADC）采样速率的函数。FWHM 为质谱峰半峰高处的峰宽

在 4 GHz, 所观测的 $[M+H]^+$ 离子完全分离, 两个化合物的质量精度均小于 1 ppm, 应用 Agilent 分子式生成器分析这两种离子, 所得分子式完全正确。另外, 在一个很窄的 m/z 范围内提取离子色谱图, 发现这两种化合物的洗脱时间仅相差 0.5 秒。结果见图 2 和图 3。

仪器动态范围

采集质谱图时, 另一个重要的因素是质谱仪的动态范围, 包括扫描间动态范围和扫描内动态范围。如果动态范围较宽, 潜在的低丰度化合物在其他高丰度基质成分的存在下也能检出。

使用 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 对一系列浓度的奈法唑酮进行检测, 作为扫描间动态范围的一个例子[2]。检测浓度从检测限 (柱上 2 pg) 到检测器饱和浓度 (柱上 100 ng) (图 4)。对于所有浓度水平, 检测得到的质量偏差都很低, 小于 2 ppm, 均通过计算得到了分子式。

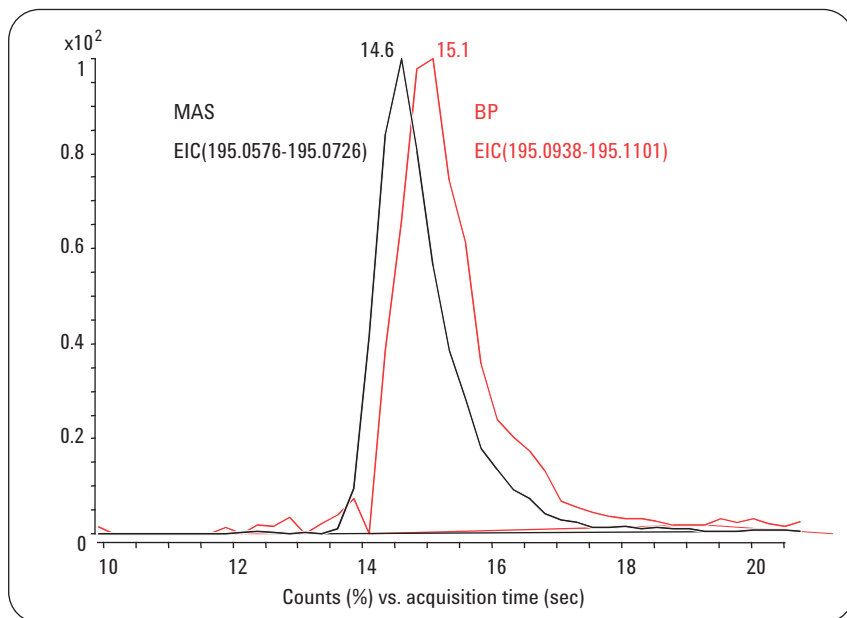


图 2
在 4 GHz 下采集得到的 MAS 和 BP 提取离子色谱图(EICs)

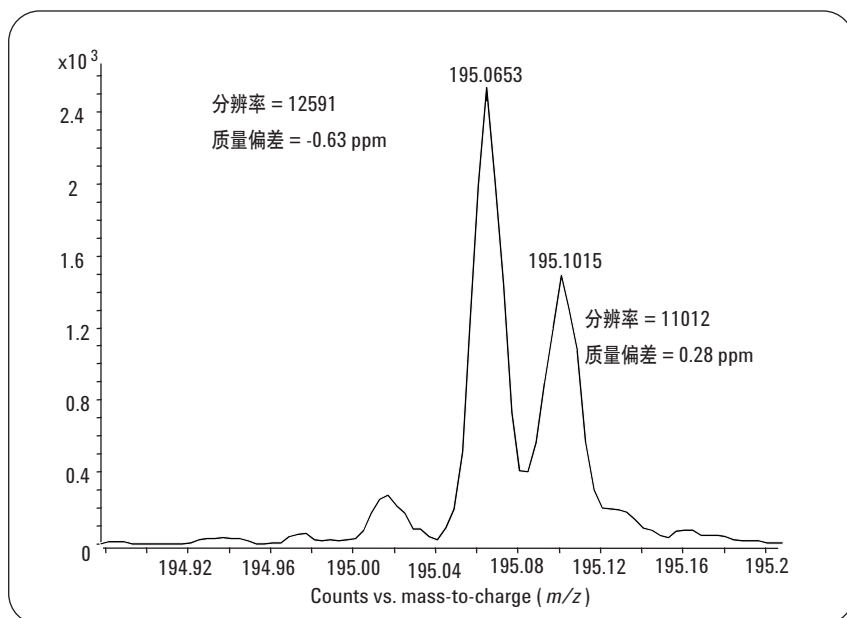


图 3
数字化速率为 4 GHz 时, MAS 和 BP 的 $[M+H]^+$ 离子, 给出了分辨率和质量误差

作为扫描内动态范围的一个例子，在浓度为 10 ng/μL 的烟酰胺存在的情况下，对浓度为 500 fg/μL 的红霉素进行检测（图 5）。结果明确表明扫描内动态范围达到 4.36 个数量级，而且准确测定了两种化合物的质量，质量精度小于 1 ppm。

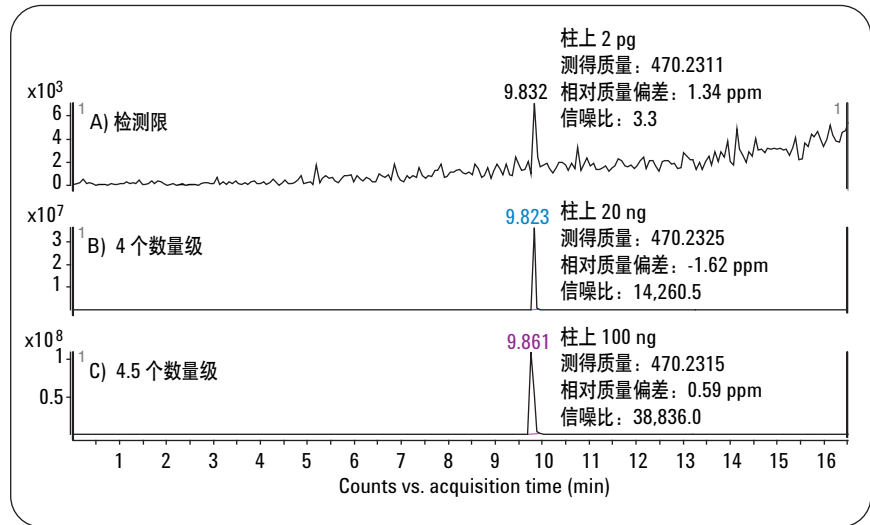


图 4
O-TOF 测定奈法唑酮的动态范围，证明了在 4.5 个数量级内质量偏差小于 2 ppm。奈法唑酮分子式 $[M+H]^+ = C_{25}H_{33}N_5O_2Cl$ ，测得质量 $m/z = 470.2317$ 。使用梯度 2 进行色谱分离。

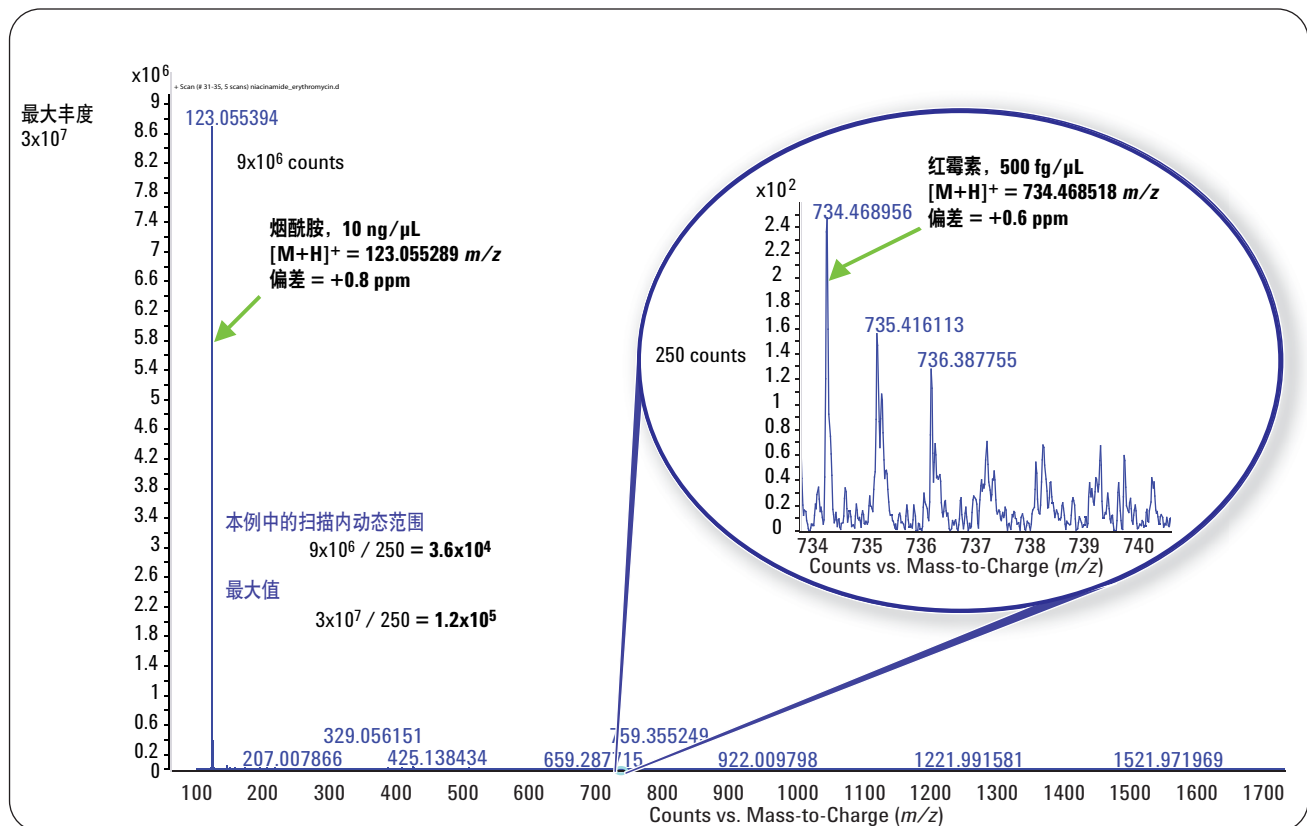


图 5
在高达 5 个数量级的扫描内动态范围进行精确质量分析

MS/MS 模式下的分辨率和质量精度

Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 能给出质量精度在 5 ppm 以内的 MS/MS 数据。这在鉴定杂质和代谢物结构方面非常有用[2]。当对表面上质量相等而分子式不同的碎片离子进行区分时,分辨率就显得非常重要。磺胺二甲氧嘧啶和司坦唑醇能产生这样的碎片离子。

与许多磺胺类药物一样,在进行 MS/MS 分析时,磺胺二甲氧嘧啶产生 m/z 156 的碎片离子。当以 Agilent 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 测定时,对该 m/z 156 的碎片进行仔细分析,发现实际有两个相差 65.4 mDa 的不同碎片离子。即使以 1 GHz 的数字化速率,也足以将这两种碎片离子分开,因此可以测量这两种碎片离子的精确质量。图 6 显示了在 1、2、4 GHz 下采集的 m/z 156 离子的 MS/MS 放大图。

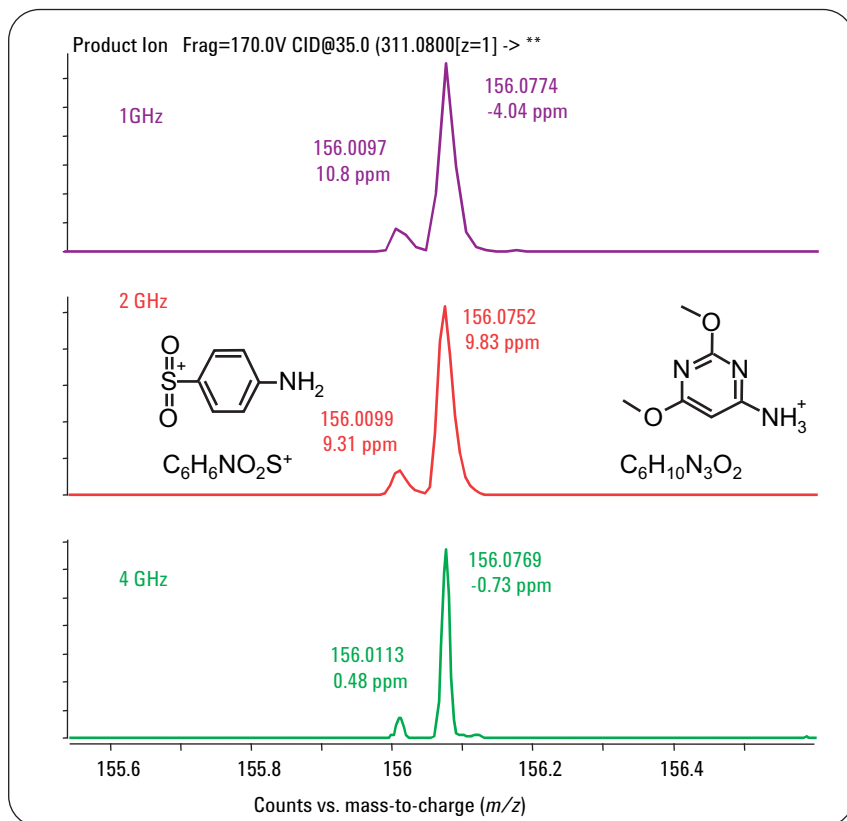


图6
对于 m/z 156 的磺胺二甲氧嘧啶裂解产物, 质量偏差是数字化速率的函数

司坦唑醇裂解产生一系列离子对(如 m/z 95, 119, 135, 147, 161),这些离子对之间的质量数仅差 25mDa (图 7)。由于差异极为微小,要采用 4 GHz 的数字化速率才能测得足够准确的质量值。图 8 显示了碎片离子 m/z 95 的测定结果。在 4 GHz 下,分辨率一般为 15,000 左右。应用安捷伦分子式生成器对该条件下采集到的 MS/MS 质谱图进行分析,得到的分子式如表 3 所示。这些分子式合理性很高,因为它们的绝对质量偏差很小,通常小于 1 mDa,而且与母离子是相符的。

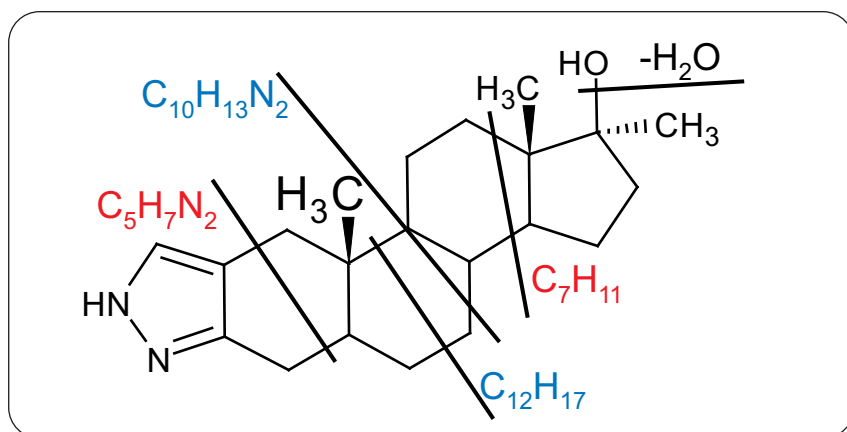


图7
司坦唑醇裂解产生的 m/z 95 (红色) 和 m/z 161 (蓝色) 碎片离子

结论

本文表明:

- 当分析质量数相同的杂质时, TOF 质谱仪分辨能力的提高, 能够改善质量精度
- 动态范围的提高, 有助于对扫描间和一次扫描内高、低丰度的化合物进行准确的质量数检测
- MS/MS 数据分辨率的提高, 能够增强获取准确质量数和分子式信息的信心, 从而更易于实现结构鉴定

参考文献

1.

Hidalgo, A. J., Fjeldsted, J. C. and Frazer, W., "The Application of High Speed Oscilloscope Analog-to-Digital Converters to Time-of-Flight Mass Spectrometry," *Proceedings 54th ASMS Conference, MPE 076*, 2007.

2.

Nägele, E., "Improving performance, data and results through expanded dynamic range and higher mass resolution," *Agilent Technologies Application Note, publication number 5989-8528EN*, 2008.

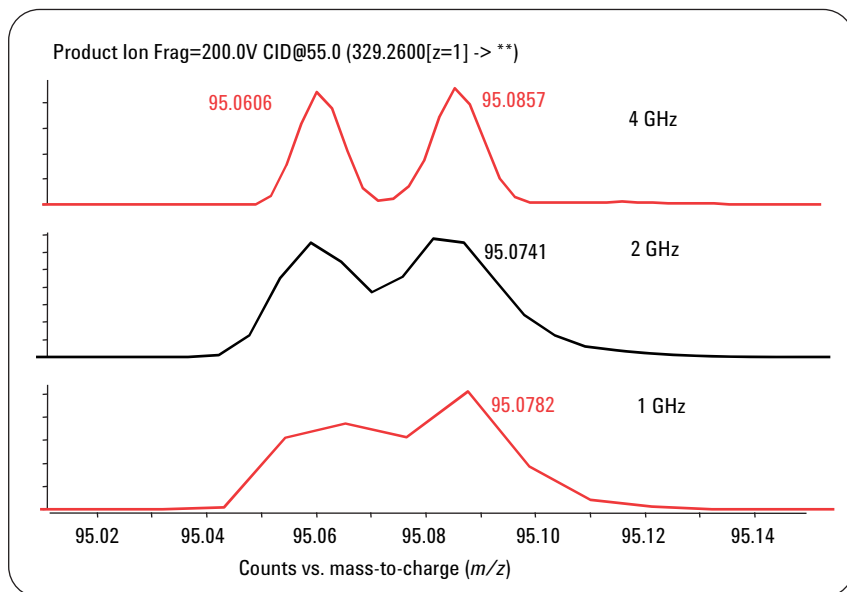


图8
司坦唑醇 m/z 值为 95 的碎片离子

实测值 m/z	计算 m/z	偏差 (mDA)	偏差 (ppm)	分子式	丢失质量	丢失分子式	丰度
95.06151	95.06037	-1.13	-11.93	$C_5H_7N_2$	234.19837	$C_{16}H_{26}O$	3495
95.08624	95.08553	-0.72	-7.53	C_7H_{11}	234.17321	$C_{14}H_{22}N_2O$	3337
119.06040	119.06037	-0.02	-0.18	$C_7H_7N_2$	210.19837	$C_{14}H_{26}O$	357
119.08578	119.08553	-0.26	-2.15	C_9H_{11}	210.17321	$C_{12}H_{22}N_2O$	1990
135.09166	135.09167	0.02	0.11	$C_8H_{11}N_2$	194.16707	$C_{13}H_{22}O$	628
135.11642	135.11683	0.41	3.05	$C_{10}H_{15}$	194.14191	$C_{11}H_{18}N_2O$	389
147.09201	147.09167	-0.33	-2.28	$C_9H_{11}N_2$	182.16707	$C_{12}H_{22}O$	376
147.11785	147.11683	-1.02	-6.96	$C_{11}H_{15}$	182.14191	$C_{10}H_{18}N_2O$	301
161.10823	161.10732	-0.90	-5.60	$C_{10}H_{13}N_2$	168.15142	$C_{11}H_{20}O$	112
161.13242	161.13248	0.05	0.32	$C_{12}H_{17}$	168.12626	$C_9H_{16}N_2O$	190

表3
从司坦唑醇 m/z 值分别为 95, 119, 135, 147, 161 的碎片离子推导得到的分子式

*Doug McIntyre 和 Pat Perkins 是
安捷伦科技公司在美国的应用化学
家， Edgar Nägele 是安捷伦科技
公司德国的应用化学家*

www.agilent.com/chem/ms:cn

© 安捷伦科技公司，2008

2008 年 1 月中国印刷
5989-9215CHCN



Agilent Technologies