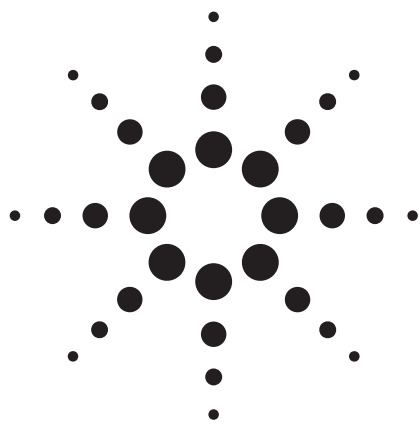




超高分辨率 Q-TOF 液-质联用系统和精确质量数用于环境样品的分析：怎样的分辨率能够满足要求？

应用简报

食品安全和环境分析

作者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman

环境质谱中心

环境工程系

美国科罗拉多大学

科罗拉多州博尔德市 80309

Jerry Zweigenbaum

安捷伦科技公司

威尔明顿，DE 19808

摘要

本研究利用安捷伦 1290 Infinity 液相色谱/6540 精确质量数 Q-TOF 液质联用系统测定分析水样中磺胺类抗生素和合成代谢类固醇的高分辨率和高质量精度。首次在四极杆-飞行时间质谱仪上，用高分辨（> 20000 FWHM）进行了符合欧盟关于禁用药物的鉴定点要求的分析。

前言

欧盟对于高分辨质谱分析食品和食物产品中禁用兽药的要求是，在 10% 峰谷的分辨率大于 10000。这相当于使用半峰宽（FWHM）时的分辨率是 20000 [1]。对于精确质量数，每个离子的鉴定点是 2 或是 2.5，如二级质谱分析，其总鉴定点是 4，因此可以对化合物进行确认定性分析 [1]。已经利用系统被用于环境水样中的鉴定点概念发表了几篇用 Q-TOF 分析水样的文章 [2]。然而，在所有发表的 TOF 应用中，10% 峰谷的分辨率都没有满足大于 10000（20000 FWHM）的最低要求条件。其原因是，飞行时间质谱在分辨率为 20000（FWHM）时无法分开小分子的碎片离子（ m/z 小于 150 的离子）。本应用简报介绍了使用超高分辨率的安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液-质联用系统用于分析液体样品中的抗生素、合成代谢类固醇和其它药物，其在 10% 峰谷的分辨率轻松超过大于 10000（20000 FWHM）的要求。



Agilent Technologies

此外，它能够区分合成代谢类固醇、康力龙的同量异构离子，可以分辨质量数相差 0.252 的 CH_2CH_2 或 N_2 [3]。之前对于这类离子的分析被认为只能靠傅里叶质谱 (FT/MS) 或轨道阱质谱 [4] 来完成。在本研究中，分析结果优于已发表文章中两种仪器得到的结果 [4]，具有更宽的质量范围，从 m/z 69 到 m/z 279。结果显示了超过 20000 (FWHM) 要求的分辨率，定义了小分子 (小于 m/z 300) 的分辨率的要求。使用一级质谱和二级质谱得到的数据精确度小于 1 ppm。本应用将讨论两个例子：根据欧盟对于兽药的法规 [5]，分析水中的磺胺类抗生素和康力龙碎裂离子。

实验条件

在安捷伦 1290 Infinity 超高分离度液相色谱仪上，在含 0.1% 甲酸：乙腈流动相的条件下，得到磺胺抗生素混合物的高分辨率色谱图。使用安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm, 1.8 μm 色谱柱 (部件号 959757-902)，梯度分析时间为 10 min。样品是组分浓度为 1 ppm 的溶液，根据灵敏度的要求，进样体积为 5-10 μL 。采用线性梯度，8 min 内从 90% B 至 100% A，维持 2 min，总共 10 min；B 为含 0.1% 的水溶液 (Sigma Aldrich)，A 为乙腈。

安捷伦喷射流离子聚焦串联四极杆质谱的条件：鞘流气温度是 375 $^{\circ}\text{C}$ ，鞘流气流速 11 L/min，干燥气温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥气流速 10 L/min，雾化器压力 45 psi，毛细管电压 4000 V (正离子模式)，喷嘴电压 0 V。碎裂电压 100 至 190 V，其它参数为自动调谐的参数。

结果与讨论

食品或水中磺胺类抗生素的鉴定

图 1 为三个磺胺类抗生素的超高压液相色谱图：磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶。其中两个抗生素被用于 ppm 浓度的猪饲料 (磺胺二甲基嘧啶和磺胺甲基嘧啶)，而磺胺二甲氧嘧啶被用于家养鸟的饮用水中；因此，它们可能会出现于食品或水里。而且有报道说，因为污水排放的关系水中经常出现磺胺类抗生素。重要的是，结果显示，高分辨率质谱很容易鉴定这些化合物，并符合欧盟关于食品或水中化合物鉴定点的要求 [1-2, 5]。

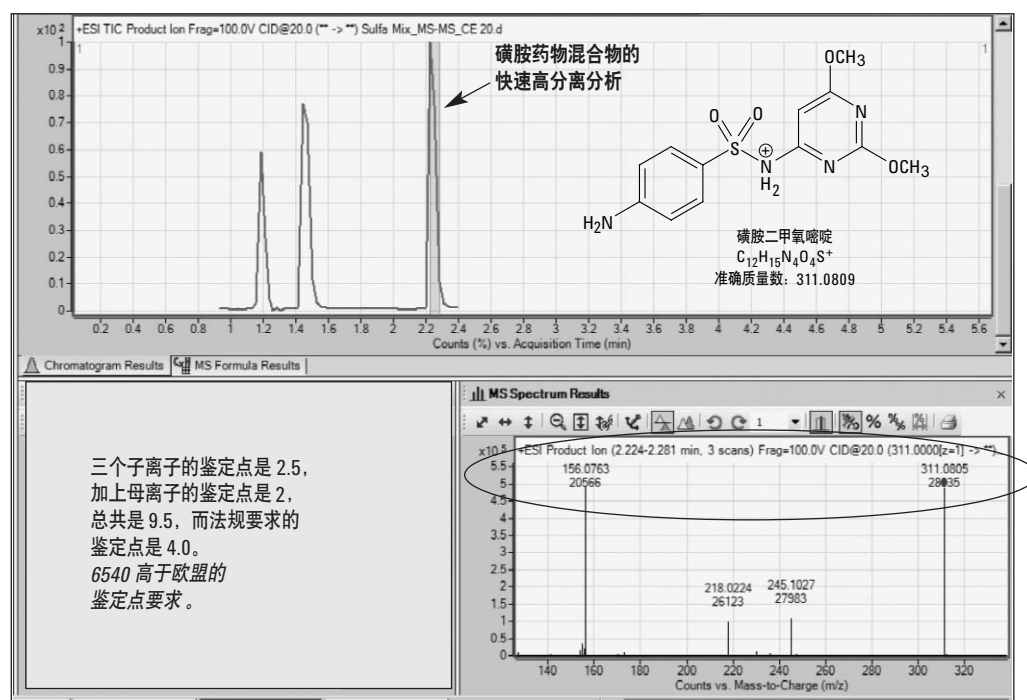


图 1. 安捷伦 6540 超高分辨率精确质量数 Q-TOF 液-质联用系统分析水中的磺胺药物

在快速梯度条件下，三个药物的分析时间小于 3 min，峰宽小于 6 s（见图 1）。磺胺二甲氧嘧啶的分子离子峰的质量精确度和分辨率见图 1。每个组分的测量质量数与理论值的误差都在 0.5 毫道尔顿内，相当于一个电子的质量。根据欧盟指令关于禁用兽药检测鉴定点的要求，分子离子峰可以得到 2 分，在二级质谱中，三个碎片离子中每个离子得到 2.5 分，总共是 9.5 分（见图 1）。所有离子的分辨率都大于 10000（10% 峰谷）或 20000

（FWHM）。磺胺类药物中有一个特征离子，其准确离子是 m/z 156.0114，见图 2，所有的磺胺类药物的碎片离子都含有这个离子。所以，这个离子的准确质量数可以用于扫描其它的磺胺类药物或代谢物。对于这个特征离子，分辨率超过最低要求值 20000（FWHM）。欧盟指令没有规定准确质量，但只是显示了测量值与理论值的误差值。还有的就是，还有一个 m/z 156 的同量异构离子，它的质量数是 156.0768，是磺胺二甲氧嘧啶的另一半结构（见图 2）。

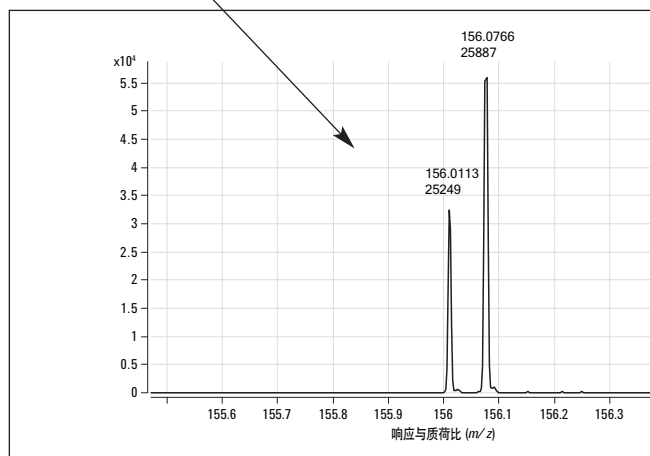
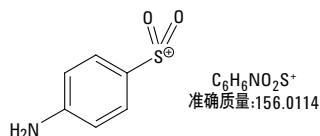
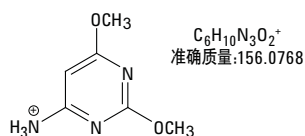
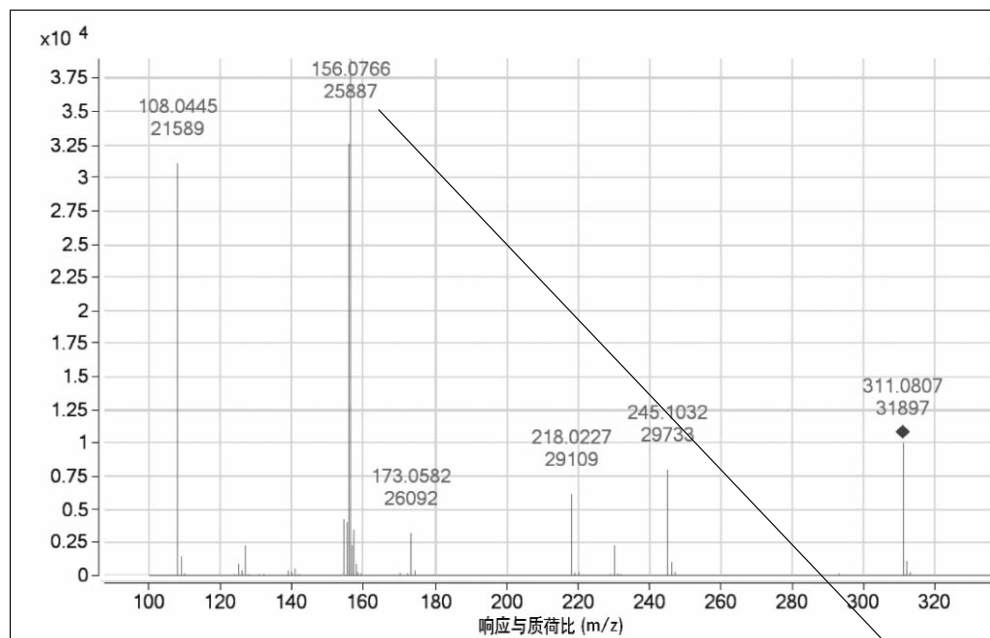


图 2. m/z 156 的同量异构离子

利用精确质量测定的磺胺二甲氧嘧啶分子式随着误差 10 ppm、5 ppm 和 2 ppm 的降低而减少，从 10 ppm 时的 10 个可能分子式，到 5 ppm 的 6 个化学式，到 2 ppm 的 2 个化学式，化学组成计算用 C、H、N、O、S 和 P。图 3 所示，对于磺胺二甲氧嘧啶，将合适的原子输入后计算得到的同位素分布结果。同位素分布中强度较高的 A+2 峰（图 3）表明，分子中含有硫元素。所以，只有误差在 2 ppm 时，才能得到正确的磺胺二甲氧嘧啶分子式。有关使用相对质量亏损来计算分子式的详细信息可参考 LC/TOF-MS 分析书中文献 3。一般情况下，根据一些知名期刊关于未知物分析的发表要求，精确度误差限值设定在 5 ppm。然而，很快能够发现，在遇到大量可能存在的分子式时，这个精度限制是不够的。因此，对高分辨率和精确质量分析来说，建议把精度误差限设为 2 ppm 以下，并且使用同位素分布和丰度。MassHunter 软件包含这些功能。

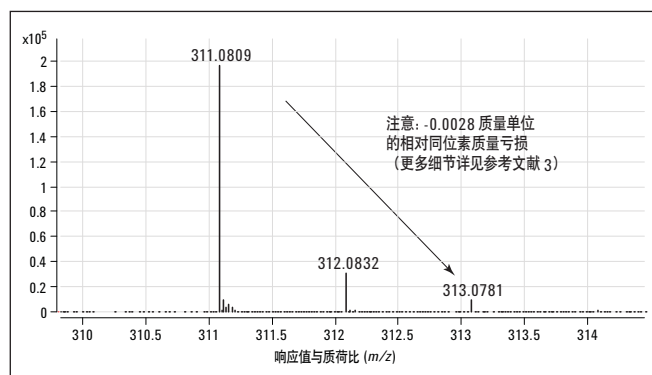


图 3. 磺胺二甲氧嘧啶的同位素分布显示了 A+1 和 A+2 离子，以及硫的相对质量亏损 [3]

康力龙：Q-TOF 液质联用仪上得到的离子的分辨率

N_2 、 CH_2CH_2 和 CO 中性丢失的分子质量数都是 28，可能这对于拥有高分辨率和精确质量数的二级质谱分析来说是最大的挑战之一 [4]。Nielen et al. [4] 的发表文献测定了康力龙（一种禁用合成代谢类固醇）的碎裂丢失，其中包括 N_2 或 CH_2CH_2 的中性丢失，误差等于 0.0252 质量单位。特别指出的是，傅里叶变换质谱和轨道阱质谱可以分辨这样的离子，他们分辨率分别是 ~ 50000 (FWHM) 和 ~ 100000 (FWHM)。此外，他们发现，Q-TOF 液质联用仪无法分离同量异构的离子，因此提出了利用超高分辨率的 Q-TOF 液质联用仪来应对这个挑战。

按照这样的方式，我们在安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液质联用上，用分辨率大于 40000 (FWHM) 的二级质谱和色谱的联合方式重复了康力龙的分析实验。如图 4 中所示的， m/z 161.1068 和 m/z 161.1317 这两个子离子代表着因为 CH_2CH_2 和 N_2 的质量差异而不同的同量异构离子。两个中性丢失分子精确计算的质量差异是 0.0252 质量单位，而测量值为 0.00249。表 1 所示为 10 个康力龙二级质谱产生的可能的同量异构丢失的中心分子。值得注意的是，所有碎片离子的平均丢失是 0.0252。这与 CH_2CH_2 和 N_2 的差异非常匹配，标准偏差为 0.0002 质量单位，小于 1%。整个质量范围内，所有碎片离子的质量精度大约是 1 ppm，分辨率为 25000 (FWHM) (见图 5)。因此，安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液质联用仪可以满足康力龙的分析要求，以及满足欧盟关于高分辨率和精确质量数质谱的规定要求。用高分辨质谱得到的分子离子峰和子离子可以准确鉴定禁用的合成代谢类固醇，如康力龙，满足欧盟鉴定点大于 4 的要求。事实上，真正测得的鉴定点等于 $2.0 + 10(2.5)$ ，总鉴定点为 27。

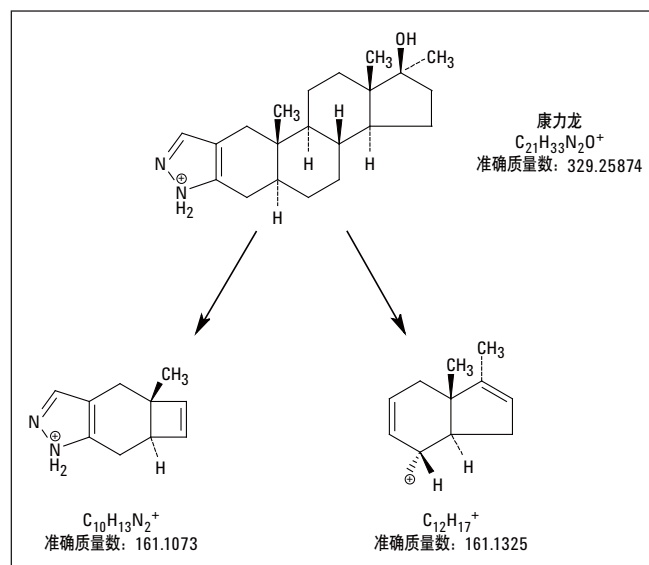


图 4. 禁用合成类固醇（康力龙）的同量异构离子，差异是乙烯离子减去双原子 ($CH_2CH_2-N_2$)，即 0.0252 质量单位

表 1. 康力龙离子的质量精度和差异

子离子	元素组成 MH ⁺	理论质量数 329.2587	测量离子的 精确质量数 329.2591	质量精 度误差 1.2 ppm	测量误差
229	C15H21N2	229.1699	229.1703	1.7	0.0252
229	C17H25	229.1951	229.1955	1.7	
189	C12H17N2	189.1386	189.1385	-0.5	0.0255
189	C14H21	189.1638	189.1640	1.1	
161	C10H13N2	161.1073	161.1068	-3.0	0.0249
161	C12H17	161.1325	161.1317	-5.0	
149	C9H13N2	149.1073	149.1072	-0.7	0.0248
149	C11H17	149.1325	149.1320	-3.4	
147	C9H11N2	147.0917	147.0914	-2.0	0.0255
147	C11H17	147.1168	147.1169	0.7	
135	C8H11N2	135.0917	135.0917	0.0	0.0252
135	C10H15	135.1168	135.1169	0.7	
119	C7H7N2	119.0604	—	—	
119	C9H11	119.0855	119.0856	0.8	
109	C6H9N2	109.0760	109.0761	0.9	0.0252
109	C8H13	109.1012	109.1013	0.9	
95	C5H7N2	95.0604	95.0604	0.0	0.0252
95	C7H11	95.0855	95.0856	1.1	
81	C4H5N2	81.0447	81.0449	2.5	0.0251
81	C6H9	81.0699	81.0700	1.2	
69	C3H5N2	69.0447	69.0448	1.4	0.0251
69	C5H9	69.0699	69.0699	0.0	
测量离子丢失					0.0252
相对标准偏差					0.0002
计算的中性丢失					0.0252

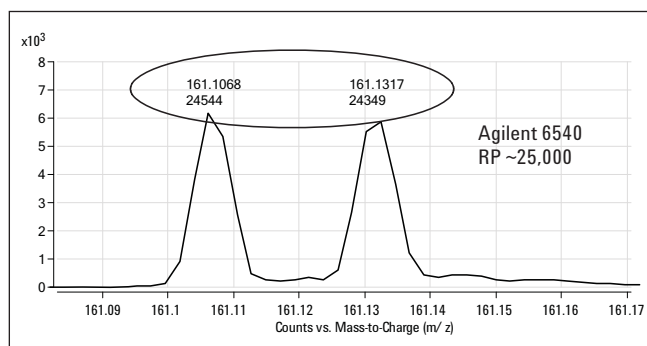


图 5. m/z 161 子离子是康力龙的同量异构子离子。安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液-质联用仪可轻易分离和鉴定这两个离子，每个子离子的鉴定点是 2.5

结论

总之，安捷伦 6540 精确质量 Q-TOF 液质联用系统在离子最大调谐质量 (m/z 2721.8948) 下的分辨率 (FWHM) 大于 40000。其同时也与快速色谱分离兼容，对最小的碎片离子分辨率可大于 20000 (FWHM)。这些性能特点可以用于食品中禁用兽药，如康力龙，的准确鉴别以及水中药物和抗生素的可靠分析。还定义了小分子鉴定所需的分辨率，满足欧盟关于高分辨质谱的要求。

参考

1. E. M. Thurman, I. Ferrer, J. A. Zweigenbaum, 2006, “高分辨精确质量数质谱用于食品中外源性物质的分析”, *Analytical Chemistry*, 78: 6703-6708
2. F. Hernandez, J. V. Sancho, M. Ibanez, 2009 Chapter 5, “使用 UHPLC-(Q)TOF MS 进行水中微量有机物的快速筛查分析”, *Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Ferrer, I. and Thurman, E.M., John Wiley & Sons, Inc., New York
3. E. M. Thurman, I. Ferrer, Chapter 2, “质量亏损、同位素分布以及精确质量数用于元素组成的测定”, *Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Ferrer, I. and Thurman, E.M., John Wiley & Sons, Inc., New York
4. M. W. F. Nielen, M. C. van Engelen, R. Zuiderent, R. Ramaker, 2007 “精确质量数飞行时间液质联用仪、傅里叶变换质谱和轨道阱质谱用于激素残留检测的筛查和确认分析标准”, *Analytical Chimica Acta*, 586: 122-129
5. O. J. L 221/8 17.8.2002; Commission Decision 2002/657/EC.

更多信息

欲了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站
www.agilent.com/chem/cn

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus:cn

安捷伦客户服务中心：
免费专线：800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：customer-cn@agilent.com

在线询价：www.agilent.com/chem/quote:cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2010
2010年11月23日，中国印刷
5991-6430CHCN



Agilent Technologies