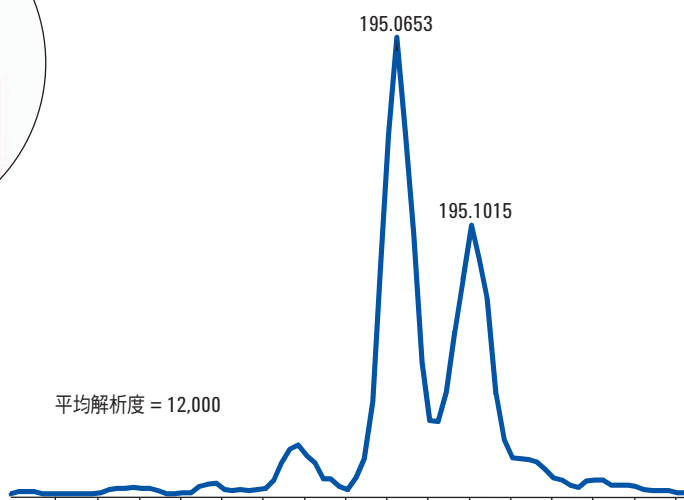


複雜樣品對精確質量分析解析度的影響

應用報告

Doug McIntyre
Pat Perkins
Edgar Nägele



摘要

本應用報告證明：

- Agilent 6520 精確質量四極柱-飛行時間 (Q-TOF) 液相層析質譜儀 (LC/MS) 和 Agilent 6220 精確質量飛行時間 (TOF) 液相層析質譜儀的性能
- Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS 和 Agilent 6220 精確質量 TOF LC/MS 的動態範圍和質量解析度都得到了提高
- 這兩種系統在質量分析和分子量計算方面具有很高的準確性
- 儀器性能的提高對樣品檢測結果的影響

Agilent 儀器

- 1200系列快速解析液相色譜系統
- 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS
- 6220 精確質量 TOF LC/MS

應用領域

- 制藥工業
- 法醫分析
- 環境分析
- 食品分析



Agilent Technologies

引言

質譜儀中，解析能力和動態範圍與質量精確度之間不存在直接關係。例如，當進行合成化合物的結構確證時，解析能力達到 200,000 以上的傅立葉變換 (FT) 質譜儀，其質量精確度一般僅比解析度為 10,000 的飛行時間 (TOF) 質譜儀高出 2 倍。對於 Agilent TOF 和 Q-TOF，當分析純化合物時，解析度提高 2~3 倍，其質量精確度並沒有表現出明顯改善。然而，當分析複雜的混合物時，結果卻截然不同。本文通過研究證明，複雜混合物分析中當化合物的子離子質量數非常接近時 (分離度 < 50 mDa)，TOF 和 Q-TOF 解析度和動態範圍的提高將如何對質量精確度產生影響。

實驗部分

儀器

Agilent 1200 系列快速解析分離液相層析系統包括：

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵和除氣機
- Agilent 1200 系列 SL 型高效自動進樣器 (ALS SL)，含恆溫裝置
- Agilent 1200 系列柱溫箱 (TCC)
- Agilent 系列 SL 型二極體陣列偵測器 (DAD SL)
- Agilent 6220 精確質量 TOF LC/MS 或 Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS
- 層析管柱 1：Agilent ZORBAX SB-C18，2.1 x 30 mm，粒徑 3.5 μm
- 層析管柱 2：Agilent ZORBAX SB-C18，2.1 x 150 mm，粒徑 1.8 μm

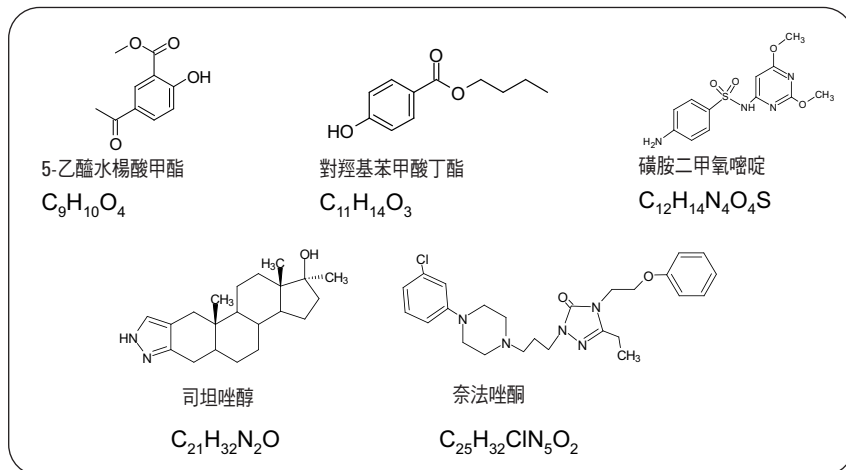


圖 1
待測化合物的結構和分子式

樣品

待測化合物 5-乙醯水楊酸甲酯 (methyl 5-acetylsalicylate, MAS)、對羥基苯甲酸丁酯 (butyl 4-hydroxybenzoate, BP)、磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine) 和奈法唑酮 (nefazodone) 均購自 Sigma-Aldrich，以甲醇溶解並製成濃度為 1 mg/mL 的儲存液。1 mg/mL 的司坦唑醇 (Stanozolol) 甲醇溶液購自 Alltech。所有溶液加水稀釋至濃度為 10~30 ng/ μL 。製備了一系列奈法唑酮的稀釋液，濃度範圍為 2 ng/mL 到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(進樣量為 1 μL 。) 化合物結構見圖 1。

LC TOF 條件

HPLC 分析條件：

- 溶劑 A：含 0.1% 甲酸的水溶液
- 溶劑 B：含 0.1% 甲酸的甲醇溶液
- 流速：0.5 mL/min，90%B 等位沖提 1 min
- 柱溫：45 $^{\circ}\text{C}$

Agilent 6220 精確質量 TOF LC/MS 資料獲取參數如下：

- 離子源：電噴噴霧 (ESI) 正離子模式，使用雙噴霧器 (為了質量參考溶液)
- 乾燥氣：10 L/min，300 $^{\circ}\text{C}$
- 霧化器壓力：45 psi
- 質量範圍：100~1000
- 掃描速率：3 次/秒
- 斷裂電壓：125 V
- 圓錐狀撒取器：60 V
- 毛細管電壓：4000 V
- 儀器狀態：1700 m/z ，1、2、4 GHz

LC Q-TOF 條件

液相色譜儀運行條件如下：

- 溶劑 A：含 0.1% 甲酸的水溶液
- 溶劑 B：含 0.1% 甲酸的乙腈溶液
- 流速：0.5 mL/min
- 梯度 1：使用層析管柱 1，柱溫 45 $^{\circ}\text{C}$ ，4 分鐘內溶劑 B 的比例由 20% 升至 60% (該層析條件用於司坦唑醇實驗)
- 梯度 2：使用層析管柱 2，柱溫 60 $^{\circ}\text{C}$ ，15 分鐘內溶劑 B 的比例由 5% 升至 75% (該層析條件用於鑒定奈法唑酮代謝產物)

Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS 的採集參數如下：

- 離子源：電噴灑 (ESI) 正離子模式，使用雙噴灑器 (為了質量參考溶液)
- 乾燥氣：10 L/min，300 °C
- 霧化器壓力：45 psi
- 質量範圍：80~1000 (MS 和 MS/MS)
- 掃描速率：3 次/秒
- 斷裂電壓：200 V
- 圓錐狀撒取器：60 V
- 毛細管電壓：4000 V
- 碰撞能量：35 V (磺胺二甲氧嘧啶) 或 55 V (司坦唑醇)
- 在設定的 MS/MS 模式下運行時，分離寬度設為中 (4 m/z)
- 儀器狀態：1700 m/z ，1、2、4 GHz

結果與討論

儀器解析度

TOF 質譜儀所表現的解析度與以下因素都有關：質量分析器的實際解析能力；偵測器電路對信號的回應以及檢測所需速度的能力。與早期數位化輸出速率 1 GHz 的型號相比，Agilent 6220 精確質量 TOF LC/MS 和 Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS 均使用反應更快的放大電路，並且真測器的數位化輸出速率可以分別達到 1、2 或 4 GHz。這種新的信號處理方式已有介紹。[1]

這類質量分析器在數位化輸出速率為 4 GHz 時， m/z 118 的解析度通常能達到 10000 以上， m/z 1522 的解析度能達到 20000 以上。數位化輸出速率對測得的解析度的影響見表 1。

從表中可以明顯看出，數位化輸出速率為 1 GHz 時，在低 m/z 處資料的採樣過鬆散，導致解析度遠遠低於儀器能力。1 GHz 的採樣速率相當於每 1 奈秒採樣 1 次，因此，對於 m/z 118 處峰寬為 1 奈秒的層析峰，採樣次數為 1。事實上，1 GHz 時，測得的 m/z 118 的解析度約為 4000。

當分析純化合物時，數位化速率由 1 GHz 變為 4 GHz 解析度可提高 2~3 倍，但卻不能明顯改善質量精確度。通常，對於分子量範圍為 100~800 之間的化合物，質量精確度為 1~2 ppm。在測定質量誤差在 10 ppm 以上的樣品時，顯然有其他化合物的同質量離子影響了檢測。因此，解析度的提高將改善複雜樣

品的質量分析精確度，從而可以從 MS 和 MS/MS 資料中獲得正確的分子式。

TOF 模式下的解析度和精確度

通過試驗，比較了 TOF 模式下分別以 1 GHz 和 4 GHz 進行數位化時的質量誤差。MAS 與 BP 的分子量相差 36 mDa。將兩種化合物以 128:1~1:1 的各種比例混合，調整流動相比例，使這兩種化合物在層析圖中不能得到分離。在 1 GHz 下，計算每個樣品的質量誤差，見表 2。

稀釋液	質量誤差 (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
數位化速率為 1 GHz 時，MAS 的質量誤差是 MAS/BP 比值的函數

m/z	到達時間 (nsec)	ΔM (mDa)	Δt (nsec)	1 GHz 下樣品的 FWHM	4 GHz 下樣品的 FWHM
118	20,000	12	1	1	4
1522	69,211	76	1.7	1.7	6.8

表 1
對於列舉的 m/z 值，質量差、時間差以及樣品數均為類比-數位轉換器 (ADC) 採樣速率的函數。半高寬 (FWHM) 為質譜峰半峰高處的峰寬

在 4 GHz，所觀測的 $[M+H]^+$ 離子完全分離，兩個化合物的質量精確度均小於 1 ppm，應用 Agilent 分子式生成器分析這兩種離子，所得分子式完全正確。另外，在一個很窄的 m/z 範圍內提取離子層析圖，發現這兩種化合物的沖提時間僅相差 0.5 秒。結果見圖 2 和圖 3。

儀器動態範圍

採集質譜圖時，另一個重要的因素是質譜儀的動態範圍，包括掃描間動態範圍和掃描內動態範圍。如果動態範圍較寬，潛在的低豐度化合物在其他高豐度基質成分的存在下也能偵測出。

使用 Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS 對一系列濃度的奈法唑酮進行檢測，作為掃描間動態範圍的一個例子 [2]。檢測濃度從偵測極限（柱上 2 pg）到偵測器飽和濃度（柱上 100 ng）（圖 4）。對於所有濃度水平，檢測得到的質量誤差都很低，小於 2 ppm，均通過計算得到了分子式。

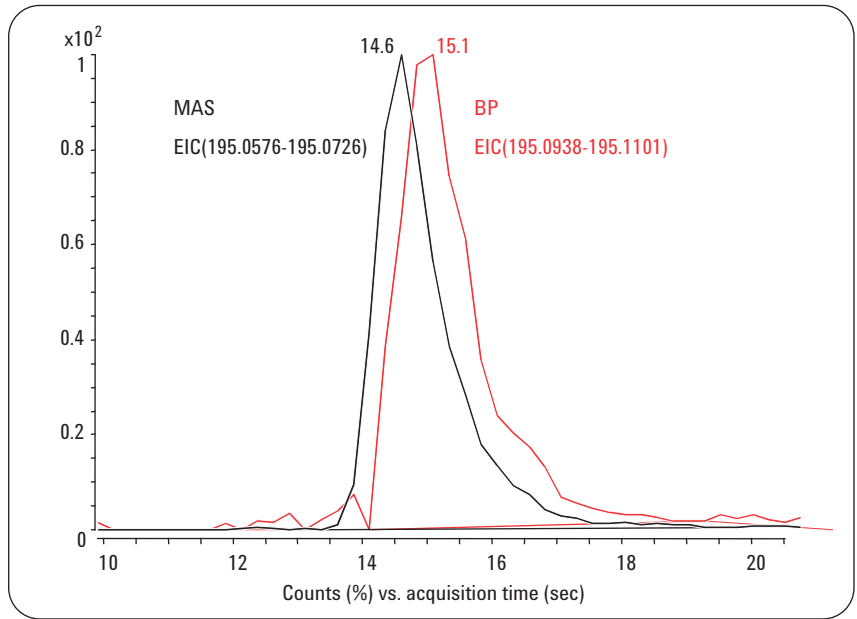


圖 2
在 4 GHz 下採集得到的 MAS 和 BP 提取離子層析圖 (EICs)

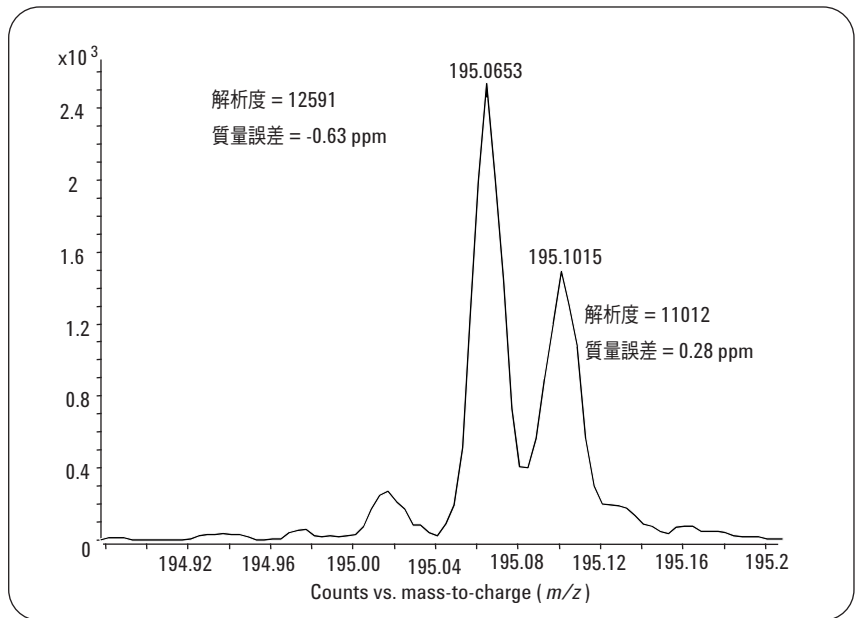


圖 3
數位化速率為 4 GHz 時，MAS 和 BP 的 $[M+H]^+$ 離子，給出了解析度和質量誤差

作為掃描內動態範圍的一個例子，在濃度為 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的菸鹼胺存在的情況下，對濃度為 $500 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 的紅黴素進行檢測（圖 5）。結果明確表示掃描內動態範圍達到 4.36 個數量級，而且準確測定了兩種化合物的質量，質量精確度小於 1 ppm 。

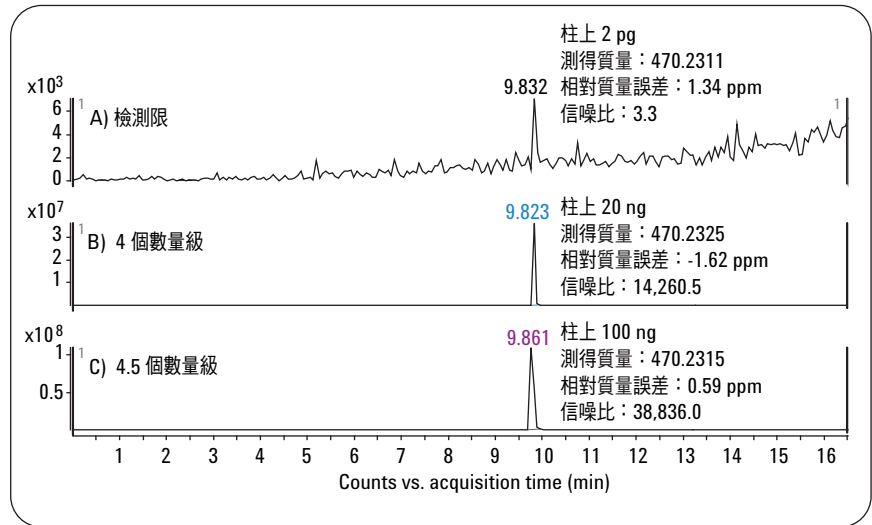


圖 4
Q-TOF 測定奈法唑酮的動態範圍，證明了在 4.5 個數量級內質量誤差小於 2 ppm 。奈法唑酮分子式 $[\text{M}+\text{H}]^+ = \text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_2\text{Cl}$ ，測得質量 $m/z = 470.2317$ 。使用梯度 2 進行色譜分離

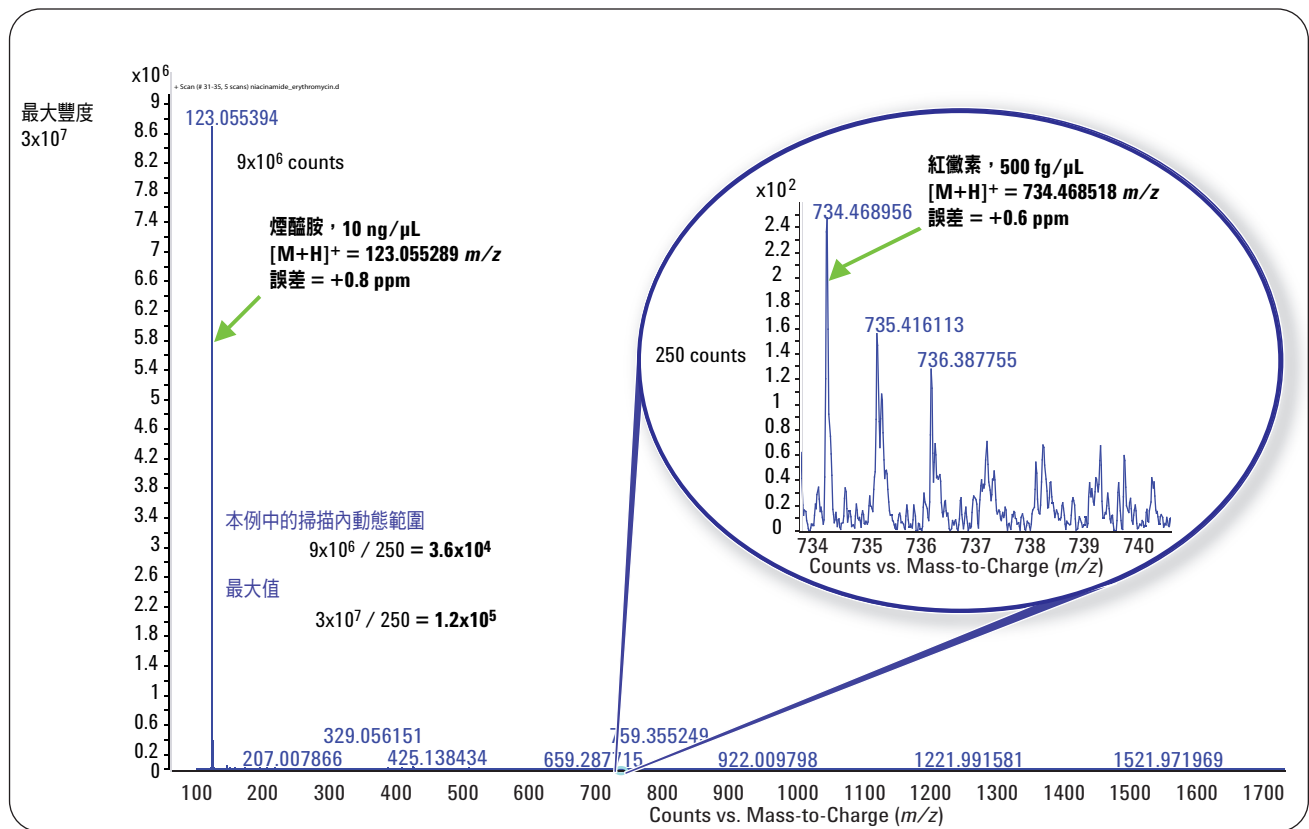


圖 5
在高達 5 個數量級的掃描內動態範圍進行精確質量分析

MS/MS 模式下的解析度和質量精度

Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS 能給出質量精確度在 5 ppm 以內的 MS/MS 資料。這在鑒定雜質和代謝物結構方面非常有用 [2]。當對表面上質量相等而分子式不同的碎片離子進行區分時，解析度就顯得非常重要。磺胺二甲氧嘧啶和司坦唑醇能產生這樣的碎片離子。

與許多磺胺類藥物一樣，在進行 MS/MS 分析時，磺胺二甲氧嘧啶產生 m/z 156 的碎片離子。當以 Agilent 6520 精確質量 Q-TOF LC/MS 測定時，對該 m/z 156 的碎片進行仔細分析，發現實際有兩個相差 65.4 mDa 的不同碎片離子。即使以 1 GHz 的數位化速率，也足以將這兩種碎片離子分開，因此可以測量這兩種碎片離子的精確質量。圖 6 顯示了在 1、2、4 GHz 下採集的 m/z 156 離子的 MS/MS 放大圖。

司坦唑醇裂解產生一系列離子對（如 m/z 95、119、135、147、161），這些離子對之間的質量數僅差 25 mDa（圖 7）。由於差異極為微小，要採用 4 GHz 的數位化速率才能測得足夠準確的質量。圖 8 顯示了碎片離子 m/z 95 的測定結果。在 4 GHz 下，解析度一般為 15,000 左右。應用安捷倫分子式生成器對該條件下採集到的 MS/MS 質譜圖進行分析，得到的分子式如表 3 所示。這些分子式合理性很高，因為它們的絕對質量誤差很小，通常小於 1 mDa，而且與母離子是相符的。

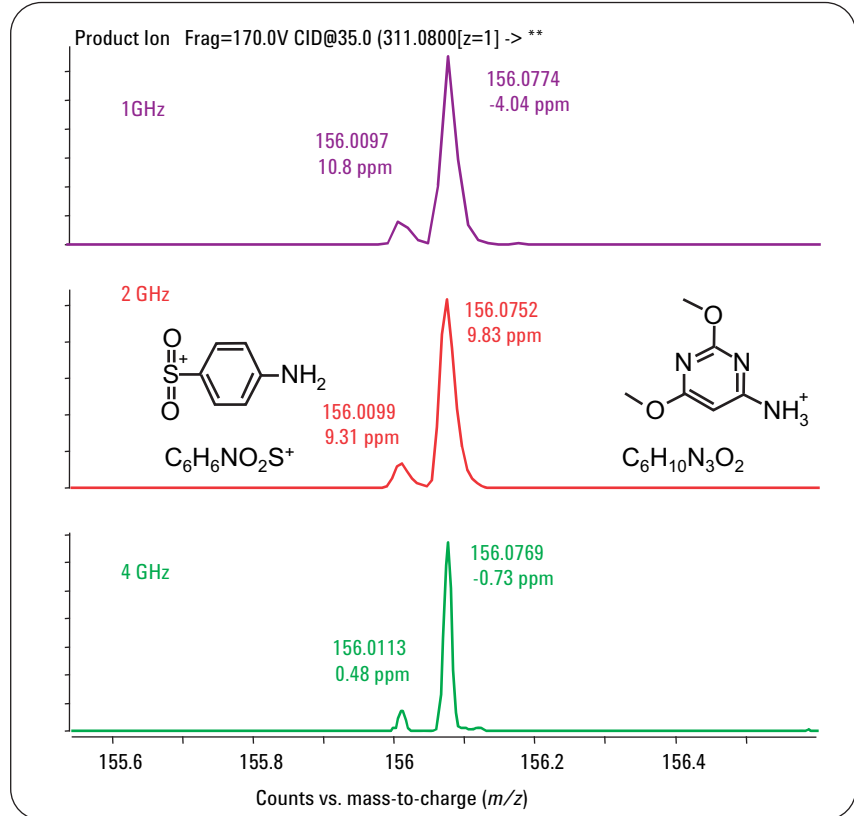


圖 6 對於 m/z 156 的磺胺二甲氧嘧啶裂解產物，質量誤差是數位化速率的函數

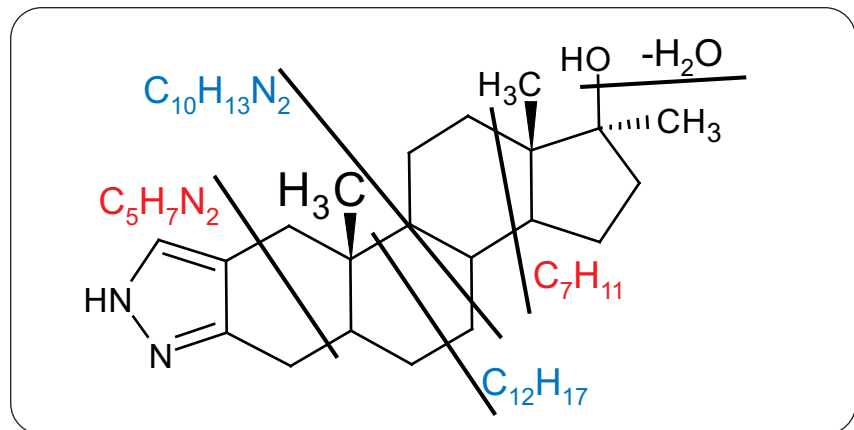


圖 7 司坦唑醇裂解產生的 m/z 95（紅色）和 m/z 161（藍色）碎片離子

結論

本文表明：

- 當分析質量相同的雜質時，TOF 質譜儀解析能力的提高，能夠改善質量精確度
- 動態範圍的提高，有助於對掃描間和一次掃描內高、低豐度的化合物進行準確的質量檢測
- MS/MS 資料解析度的提高，能夠增強獲取準確質量數和分子式資訊的信心，從而更易於實現結構鑒定

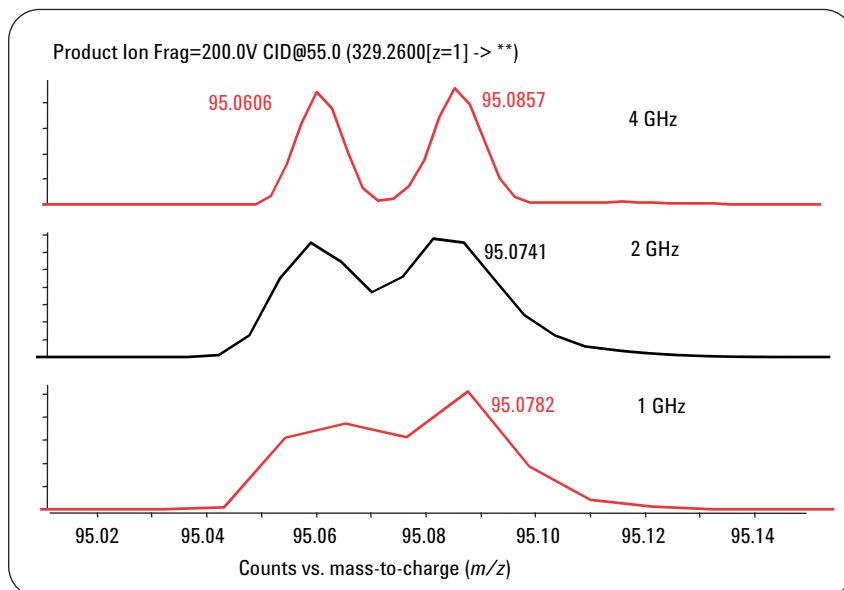


圖 8
司坦唑醇 m/z 值為 95 的碎片離子

實測值 m/z	計算 m/z	差異 (mDA)	差異 (ppm)	分子式	損失質量	損失分子式	豐度
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
從司坦唑醇 m/z 值分別為 95、119、135、147、161 的碎片離子推導得到的分子式

參考文獻

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.*

Doug McIntyre 和 *Pat Perkins* 是安捷倫科技公司在美國的應用化學家，
Edgar Nägele 是安捷倫科技公司德國的應用化學家

www.agilent.com/chem/ms

本文資訊如有變更，恕不另行通知。

© 台灣安捷倫科技股份有限公司，2011

Printed in Taiwan，2011 年 8 月 23 日

5989-9215CHTW