



高分辨质谱下的化合物鉴定-如何确定分子式和结构

李立军

如何从一张质谱图判断是什么化合物

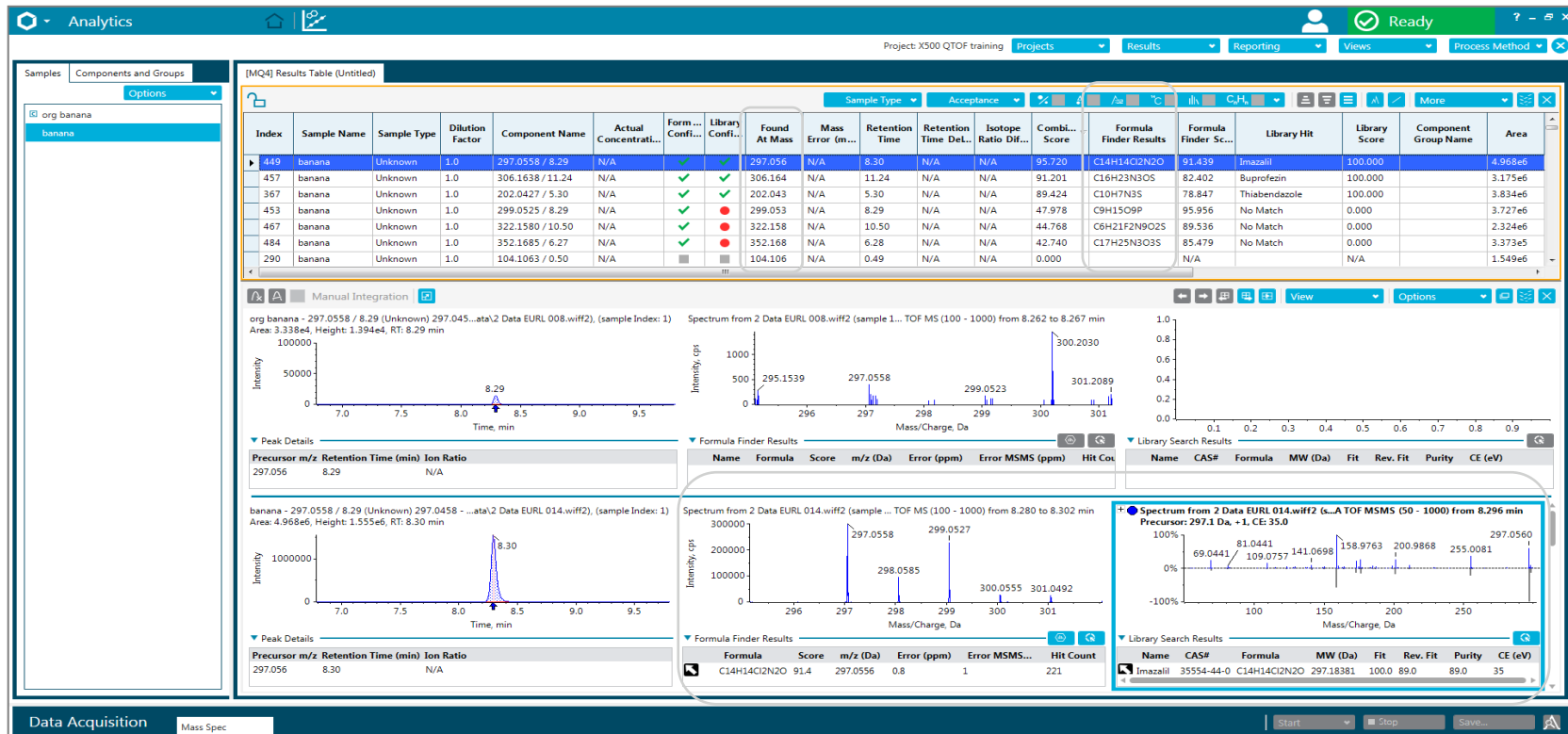
- 谱图是否正确？纯度如何？经过GC/LC分离了吗？
- 已知物？未知物？
- 低分辨？高分辨？离子化类型：EI,ESI,MALDI,DART 等等。
- 找色谱峰，其中的质谱图，包含分子离子及碎片信息。
- 多电荷还是单电荷离子？加和离子？几聚体？仅有碎片？
- 一级质谱，找对分子离子，再确定分子式（不仅依靠一级，二级也很重要）
- 进一步推断结构式，有谱库？无谱库？

根据上一讲，我们已经确定母离子，下一步就是分子式和结构式的推断。

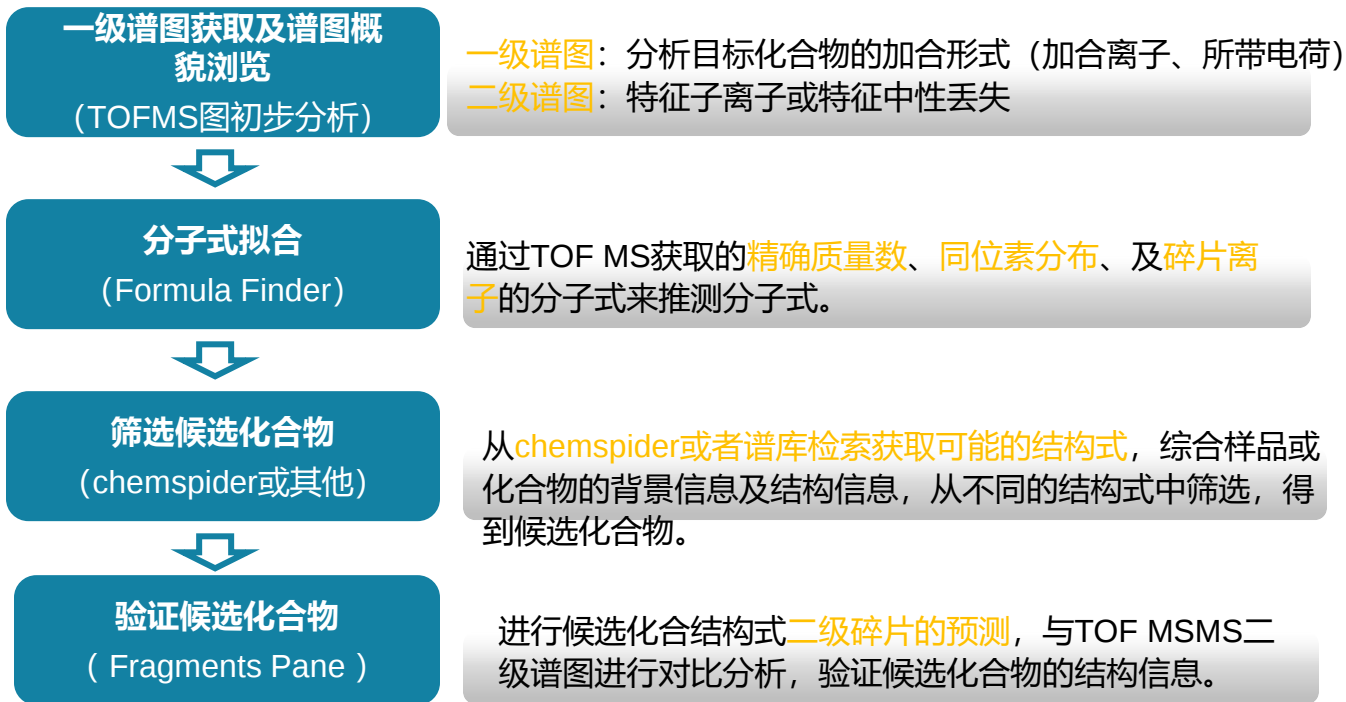
- 1, 根据一级质谱图推测元素组成：未知化合物一级谱的手动解析和SCIEX软件的辅助解析功能使用。
- 2, 碎片离子的类型及碎裂方式。
- 3, 根据二级质谱图验证分子式：未知化合物二级谱的手动解析和SCIEX软件的辅助解析功能使用。
- 4, 谱库检索给出的参考信息，筛选及确定结构式的方法。
- 5, 大气压电离下化合物的常见裂解规律。

未知化合物的解析 (小分子化合物)

利用SCIEX OS软件, 如果谱库中含有目标化合物, 那么许多步骤可以一次完成

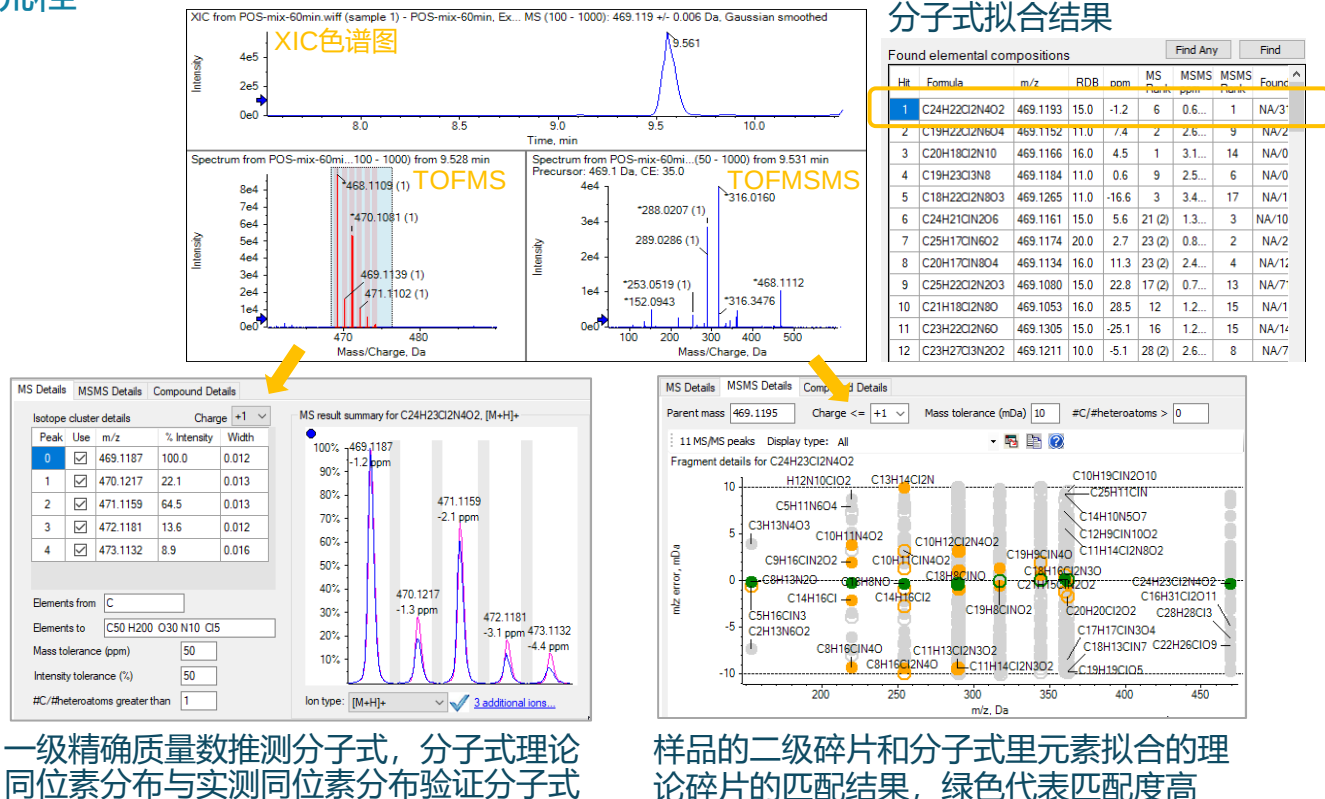


未知化合物的解析流程（小分子化合物）



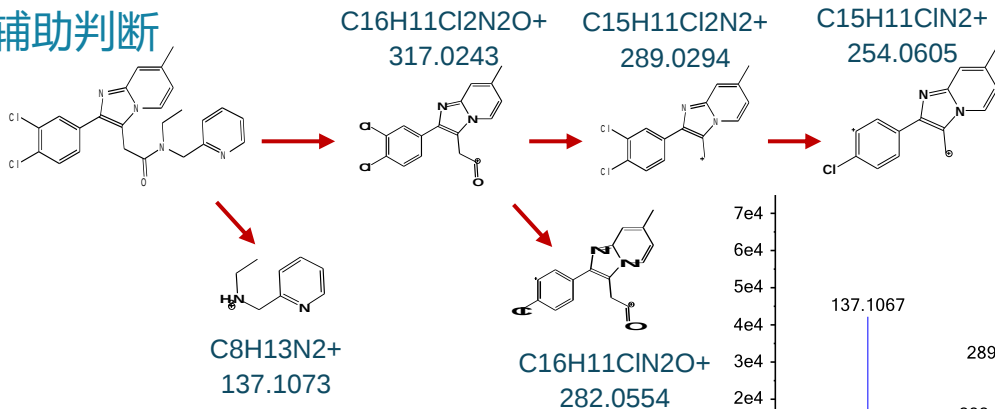
分子式拟合 (Formula Finder)

分子式拟合流程



分子式拟合 (Formula Finder)

碎片离子辅助判断

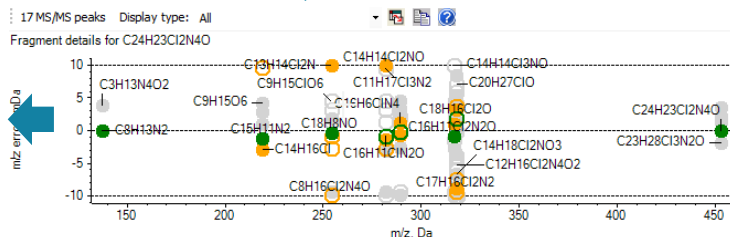
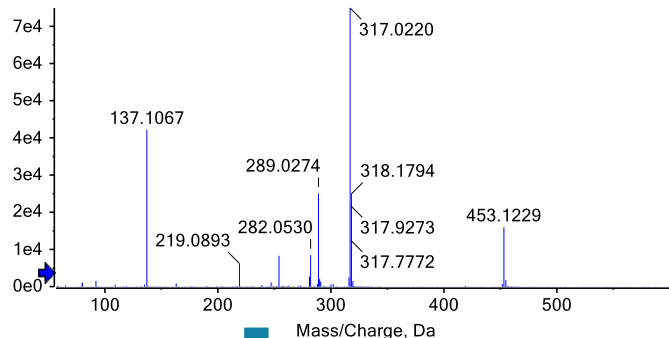


子离子也可拟合出碎片的分子式，碎片的分子式应与母离子的分子式相关。

Hit	Formula	m/z	RDB	ppm	MS Rank	MSMS ppm	MSMS Rank
1	C18H27Cl3N4O3	453.1222	6.0	3.6	3	3.5...	1
2	C24H22Cl2N4O	453.1243	15.0	-1.2	2	1.8...	3
3	C23H27Cl3N2O	453.1262	10.0	-5.2	4 (2)	3.9...	2
4	C23H26Cl2O5	453.1230	10.0	1.8	1	9.8...	4
5	C17H31Cl3O7	453.1208	1.0	6.6	4 (2)	14...	5

一级谱图共拟合出10个分子式，结合二级碎片离子分子式缩减为5个，正确的分子式综合顺序为2

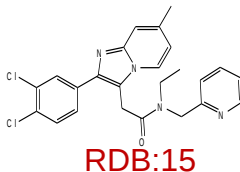
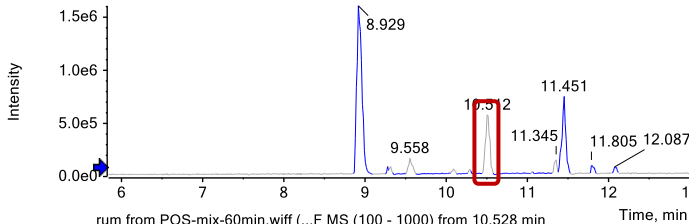
子离子的产生及其相对丰度与化合物的结构式（化学键）及产物离子的稳定性及碰撞能量有关。



分子式的选择

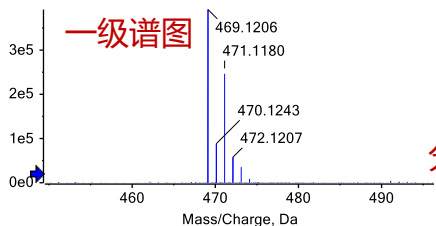
母药C₂₄H₂₂Cl₂N₄O的代谢产物分析

BPC from POS-mix-60min.wiff (sample 1) - POS-mix-60min, Experiment 1, +TOF MS (100 - 1000)



在无结构的重要部分丢失时，杂质、降解产物或代谢物的“不饱和度”（RDB）应与“母体”分析物的不饱和度密切相关，RDB也是确认分子式的重要参考信息

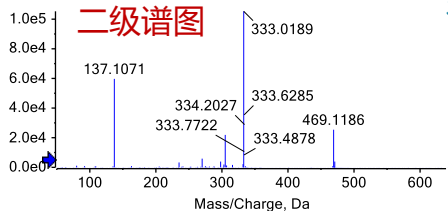
run from POS-mix-60min.wiff (...F MS (100 - 1000) from 10.528 min



分子式拟合

如何选择?

run from POS-mix-60min.wiff (... MS*2 (50 - 1000) from 10.531 min
rsor: 469.1 Da, CE: 35.0



共拟合出36个可能的分子式

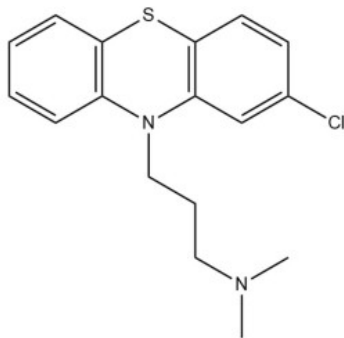
Hit	Formula	m/z	RDB	ppm	MS Rank	MSMS ppm	MSMS Rank
1	C14H31Cl2N4O5PS	469.1203	1.0	-0.8	1	1.7...	4
2	C24H22Cl2N4O2	469.1193	15.0	1.4	4	0.6...	1
3	C16H26Cl2N6O4S	469.1186	6.0	2.8	3	1.4...	3
4	C15H31Cl3N4O4S	469.1204	1.0	-1.1	14	4.9...	2
5	C17H27Cl2N4O5P	469.1169	6.0	6.4	5 (2)	3.5...	10
6	C21H26Cl2N4O2S	469.1226	10.0	-5.8	11 (3)	2.8...	9
7	C22H27Cl2N2O3P	469.1209	10.0	-2.2	5 (2)	1.0...	14
8	C15H26ClN6O5PS	469.1184	6.0	3.1	19	1.6...	6
9	C19H23Cl3N8	469.1184	11.0	3.2	16 (2)	1.9...	7
10	C22H21ClN6O2S	469.1208	15.0	-1.9	23	1.5...	5
11	C15H32Cl2N2O6P2	469.1185	1.0	2.9	2	4.9...	20
12	C16H32Cl3N2O5P	469.1187	1.0	2.5	15	5.0...	12
13	C18H27Cl3N4O4	469.1171	6.0	6.0	24 (2)	5.6...	8

不饱和度 (环加双键值) Ω

- 不饱和度：分子中双键的数目和环数的总和就是该分子的环加双键值。
- 分子式 $(C+Si)_x(H+X)_y(N+P)_z(O+S)_n$ 其中X代表卤素，可计算出环加双键值。

$$\text{环加双键值} \Omega = (2x + 2 + z - y) / 2$$

- 不饱和度可以帮助确认化合物结构的正确性。
- 通常，奇电子离子： Ω 为整数($r + d$)；偶电子离子： Ω 为非整数($0.5r + d$)



氯丙嗪 Chlorpromazine

分子式 $C_{17}H_{19}ClN_2S$

$$\Omega = (2 \times 17 + 2 + 2 - (19 + 1)) / 2 = 9$$

奇电子离子:

El模式下, $M^+ \cdot$ $C_{17}H_{19}ClN_2S^+ \cdot$

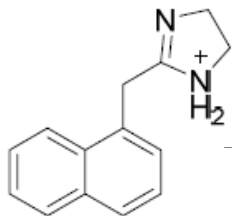
$$\Omega = (2 \times 17 + 2 + 2 - (19 + 1)) / 2 = 9$$

偶电子离子:

ESI模式下, $[M+H]^+$ $C_{17}H_{20}ClN_2S^+$

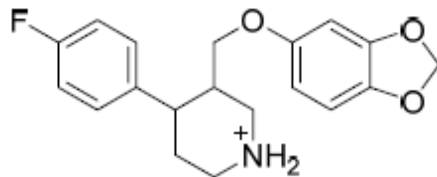
$$\Omega = (2 \times 17 + 2 + 2 - (20 + 1)) / 2 = 8.5$$

偶电子离子的氮规则示例 (以ESI电离方式为例)



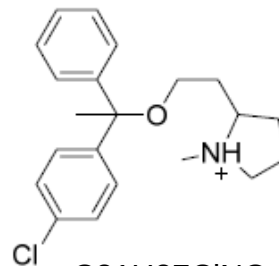
$C_{14}H_{15}N_2^+$

$[M+H]^+ \text{ m/z } 211$



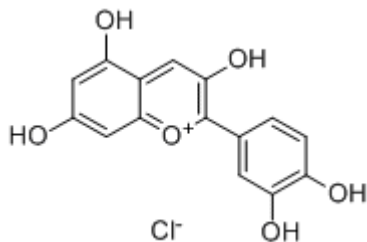
$C_{19}H_{21}FNO_3^+$

$[M+H]^+ \text{ m/z } 330$



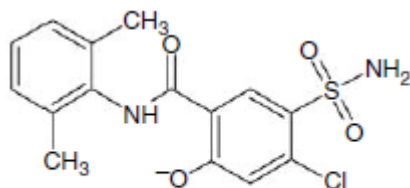
$C_{21}H_{27}ClNO^+$

$[M+H]^+ \text{ m/z } 344$



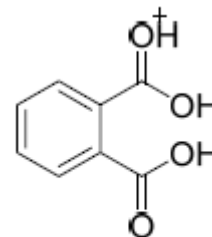
$C_{15}H_{11}O_6^+$

$[M-Cl]^+ \text{ m/z: } 322.0$



$C_{15}H_{14}ClN_2O_4S^-$

$[M-H]^+ \text{ m/z } 353$



$C_8H_7O_4^+$

$[M+H]^+ \text{ m/z } 167$

分子式拟合 (Formula Finder)

总结

- 数据采集的质量。
- 谱图的质量数校正。

一级离子质
量数准确度

一级离子同
位素分布
(谱图质量)

- 化合物的质谱强度较弱时，同位素响应偏差会变大，反而影响分子式的拟合。

分子式
拟合

分析物的背
景信息

该母离子
有无二级谱
图及二级谱
图的质量

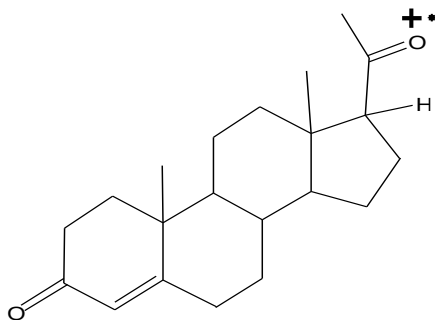
- 影响分子式拟合元素范围的设置。
- 影响候选分子式的选择。

当基质比较复杂，目标母离子可能会采集不到二级信息。可在IDA方法设置中利用质量亏损触发或同位素丰度触发等高级设置，有针对地进行目标离子的二级信息采集。

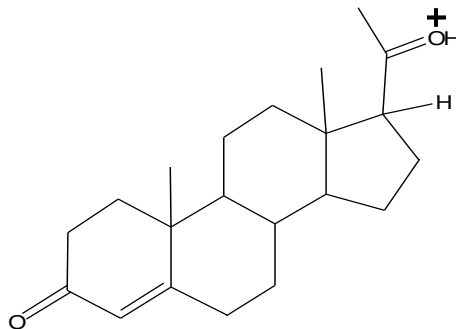
奇电子离子 (OE) 和偶电子离子 (EE)

什么是奇电子离子 (OE) 和偶电子离子 (EE)

- 奇电子离子(Odd-Electron ion): 含有一个未成对电子的离子, $M^{+\bullet}$ 或 $M^{-\bullet}$
- 偶电子离子(Even-Electron ion): 不含未成对电子(即电子全配对)的离子, $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, 等。



$M^{+\bullet}$, m/z : 314



$[M+H]^+$, m/z : 315

孕酮 Progesterone

$C_{21}H_{30}O_2$, $MW=314.2$

- EI电离方式下，通常形成奇电子离子 (OE); 化合物电离是在高真空条件下，气相分子与EI离子源中发射的70eV(可以调节)电子相互作用的结果。电子轰击的结果是导致气相分子丢失一个电子，从而形成分子离子 $M^{+\bullet}$ ； $M^{+\bullet}$ 通常携带富余能量，导致发生再次裂解。这种裂解通常导致两种产物：一个m/z更低的离子和一个中性分子或自由基。而OE离子产生的碎片可能是OE也可能是EE；



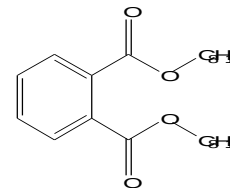
- ESI电离方式下，通常形成偶电子离子 (EE)；EE经CID碎裂后形成的碎片绝大多数也是EE；只有少数情况下，经过自由基途径生成碎片离子，才出现OE离子。



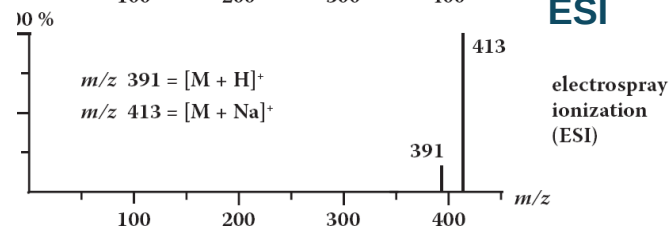
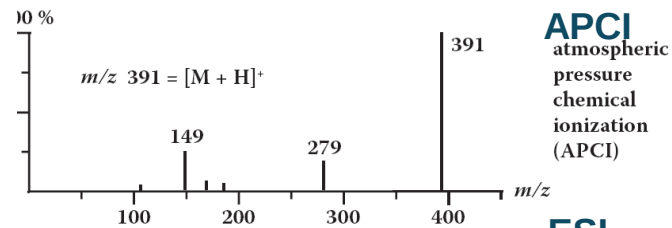
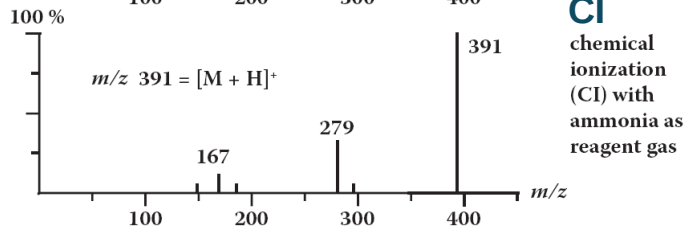
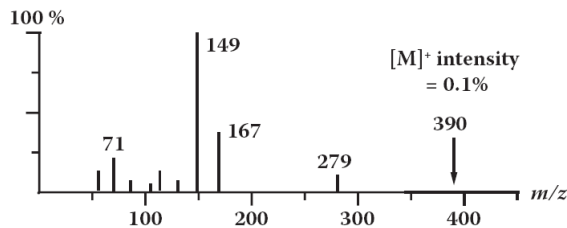
- 通常情况下，化合物的EI谱与ESI谱有一定差异，并且它们的碎裂规律也会有区别。EI的碎裂规律已经有较多文献介绍。而对ESI源下化合物的裂解途径的规律介绍，相对比较稀少。

不同离子化模式下得到的质谱图示例

- EI属于硬电离，通常比较难得到分子离子峰；
- CI/APCI/ESI则属于软电离方式，通常可以得到明显的准分子离子峰或分子离子峰；

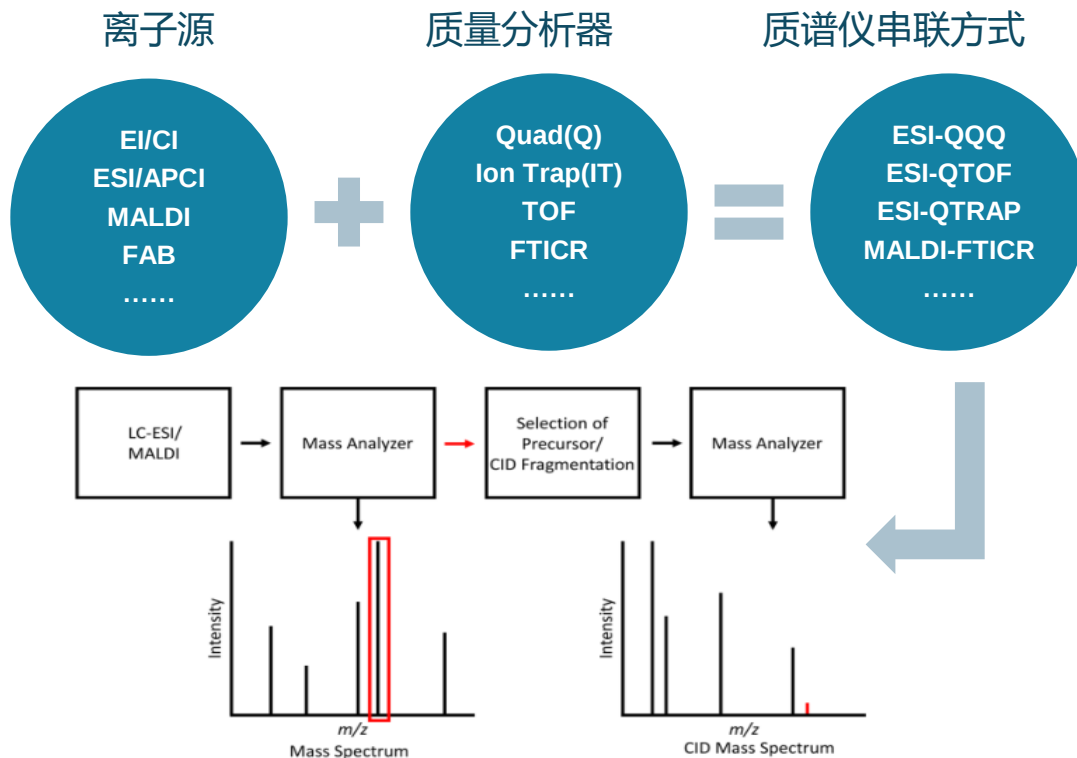


邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯
Diethyl phthalate
C₂₄H₃₈O₄, MW=390.56



质谱的常见碎裂解离方式

串联质谱：通常是至少两个以上的质量分析器串联，从而实现更多复合功能。



几种裂解方式

CID碰撞诱导裂解(collision induced dissociation,CID)

HCD高能诱导裂解(Higher energy Collision induced Dissociation)- 使用的激发能量主要通过射频电压实现离子的碎裂，在同一个质量分析器内完成多次诱导裂解，在离子阱类质量分析器中常用，质谱裂解规律基本相同。

电子活化解离(Electron-activated disaction, **EAD**)最新的基于电子碎裂技术。

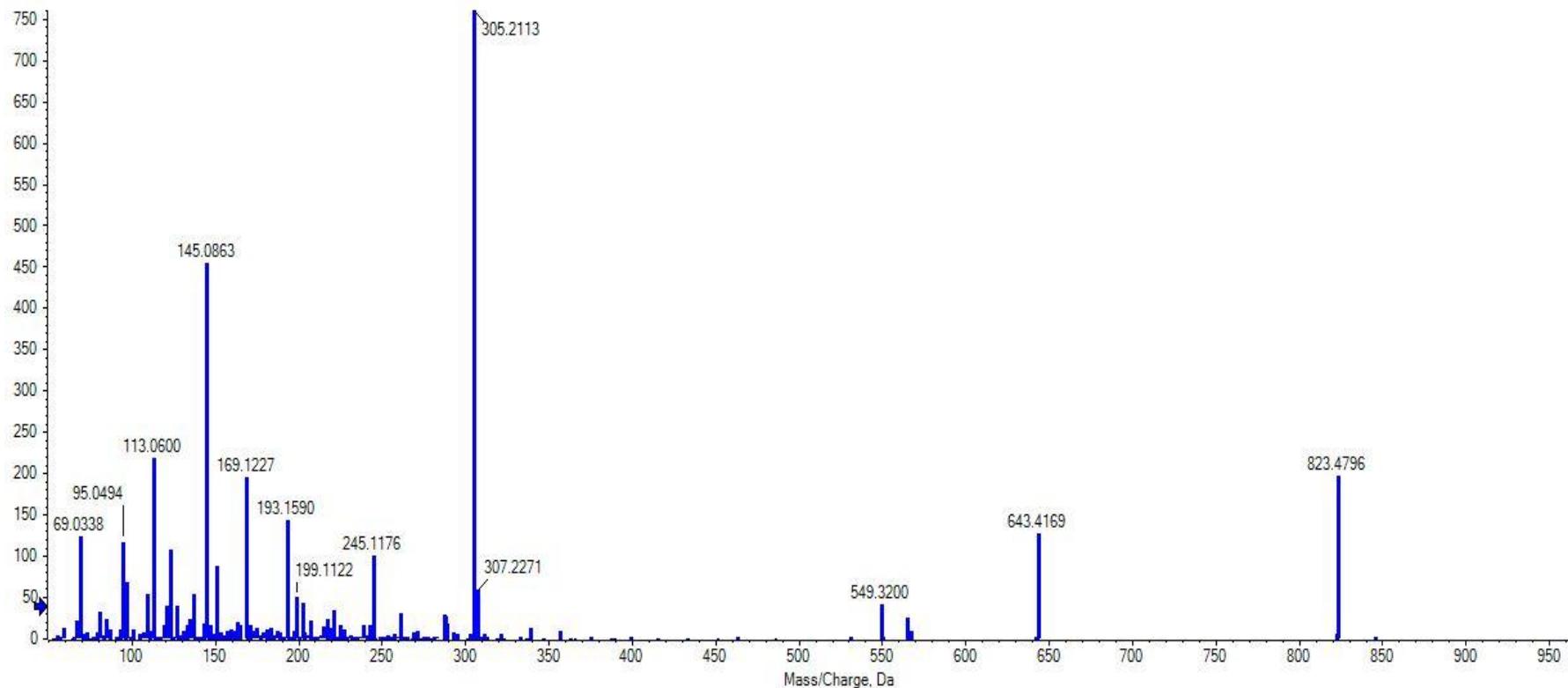
电子转移裂解(ETD),电子捕获解离(ECD) -通常ECD/ETD适用于FT-ICR质谱仪，多应用于蛋白质鉴定的分析。

还有其它多种裂解方式，包括表面诱导离解(SID)、红外多光子离解(IRMPD)、紫外光离解(UVPD)等，未包括源内裂解。

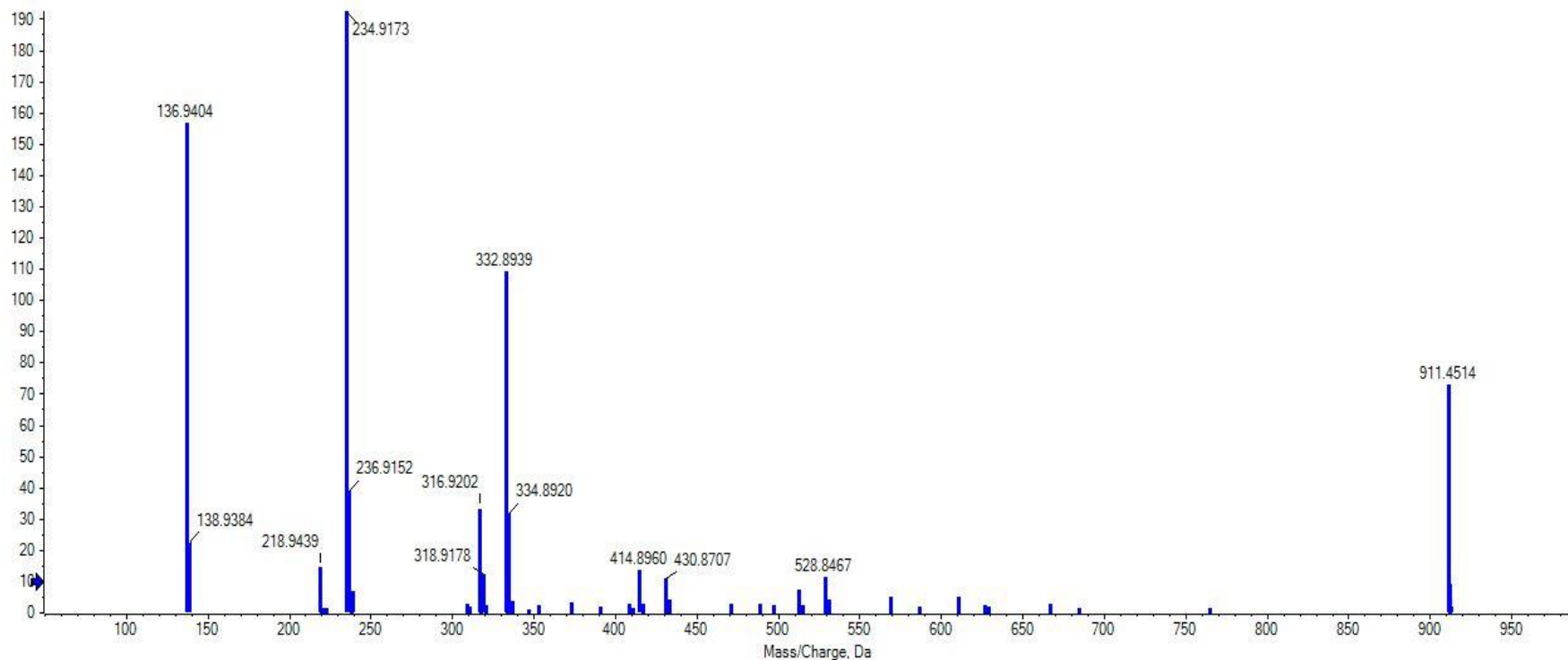
本篇以低能量CID为主，主要使用的是四极杆串联线性离子阱（QTRAP）和四极杆串联飞行时间质谱（QTOF）得到的产物离子碎片质谱信息。

- 加和离子的裂解 –通常以加减质子的二级谱图找规律容易，对于金属离子加和物，通常碎片不会加上铵，钾等，寻找裂解规律相对困难。
- 源内裂解 –类似于CID，但因为谱图不纯，不利于解析。
- 正离子与负离子 –裂解规律不完全相同。
- 碰撞活化裂解能量 –通常采用不只一个能量碰撞，以得到丰富的碎片，规律易寻。
- 不同气体对裂解的影响 –碰撞气分子量越大，化合物被打得越碎，但碎片过多并不都好。
- 如果开放一级窗口宽度，SWATH，碎片包含同位素，更好解析确认。

阿维菌素+NH₄的二级质谱

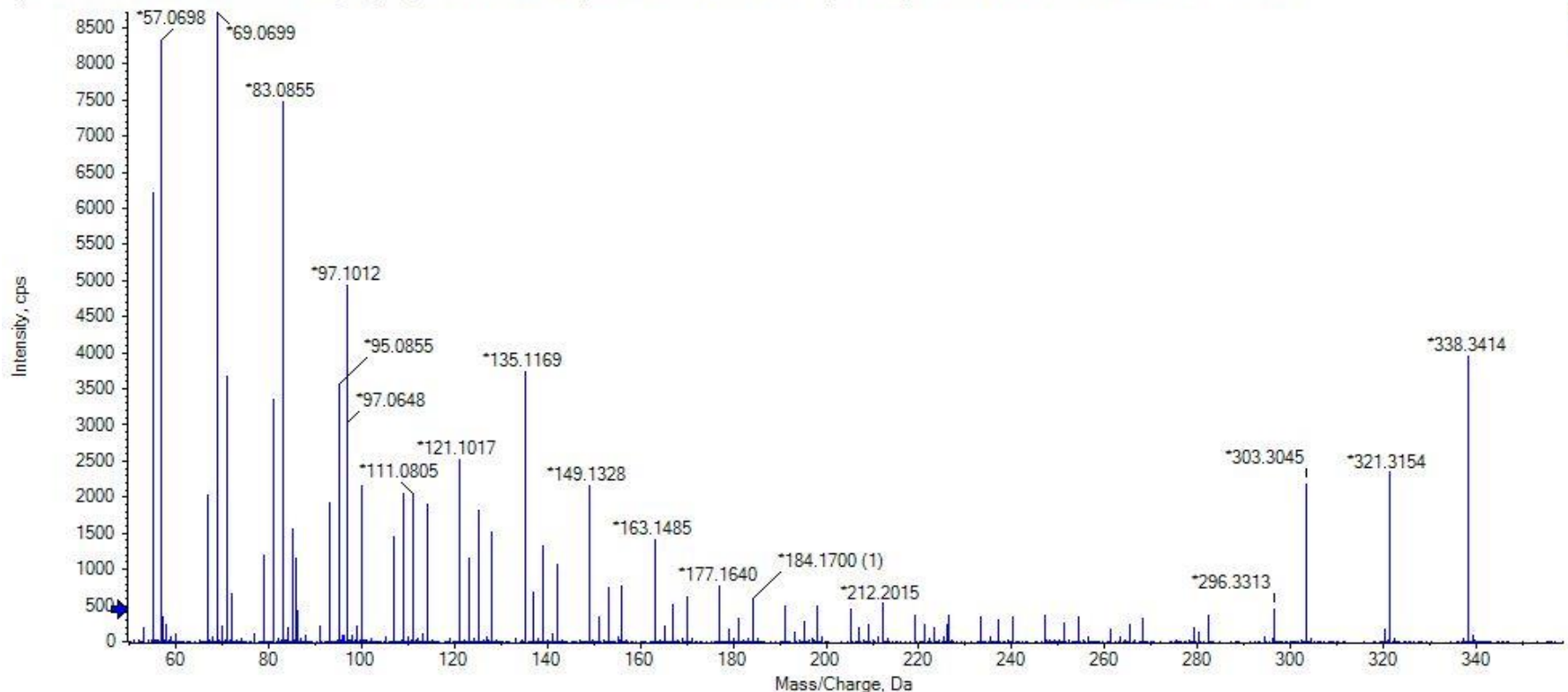


阿维菌素+K的二级质谱





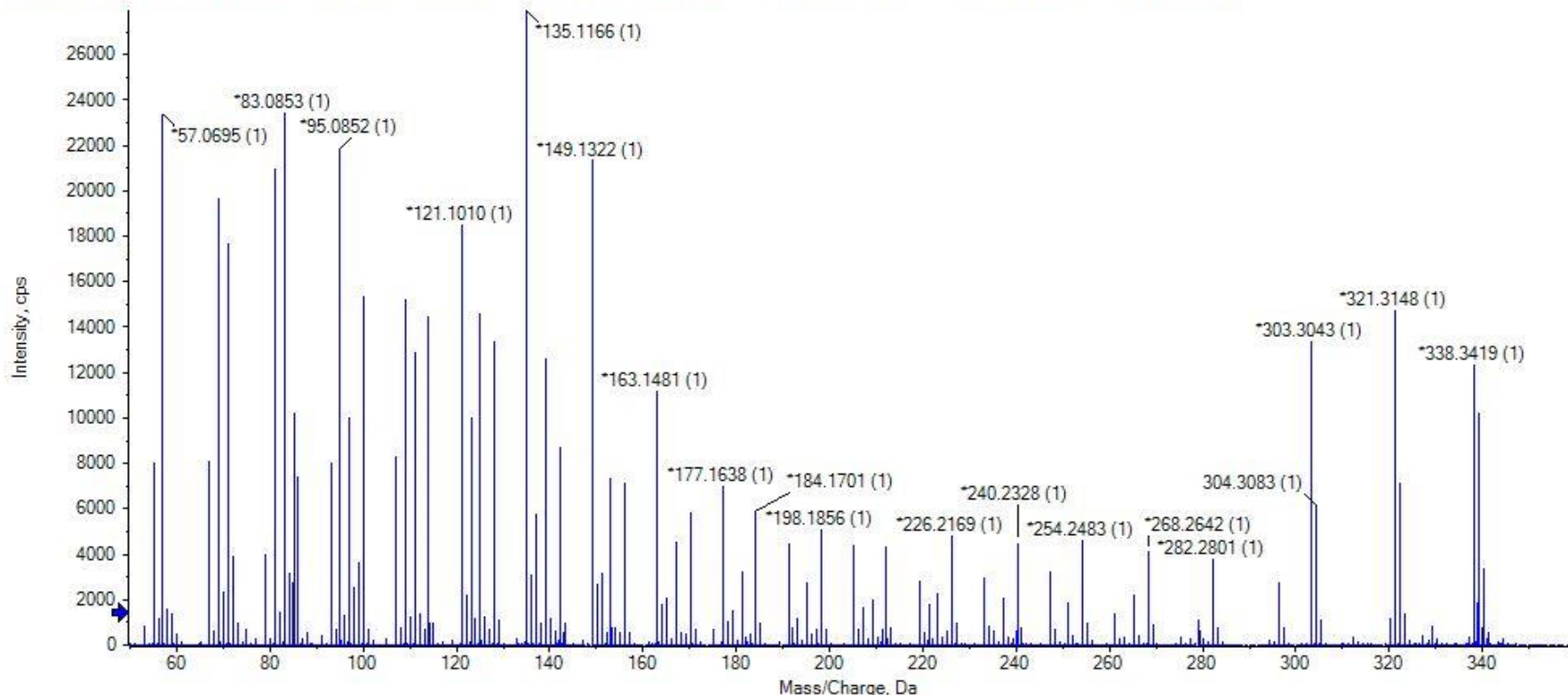
Spectrum from 20220426ANTB200.wiff2 (sample 5) - ANTB-STD200, Experiment 2, +IDA TOF MSMS (50 - 1000) from 24.948 min Precursor: 338.3 Da, CE: 35.0



SWATH模式的MS2(母离子窗口25Da)



Spectrum from 20220426ANTB200-SWATH.wiff2 (sample 1) - ANTB-STD200, Experiment 8, +SWATH TOF MSMS [324 - 350] (50 - 1000) from 25.060 min

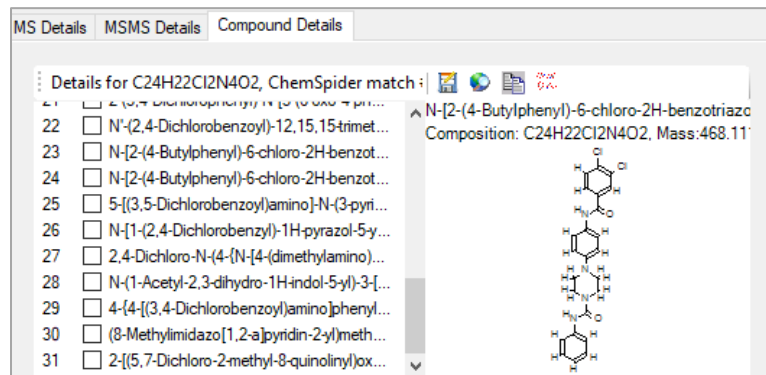


候选化合物结构式的获取

对于未知的分子式，可以在许多化学结构数据库中进行搜索，比如：

- PubChem (超过9400万个化合物, 2017年2月)
- Chemspider (约5800万个化合物, 2017年2月)
- SciFinder (超过1.26亿个化合物, 2017年2月)

注意：每个数据库都包含一系列化合物，但没有一个数据库是完整的，也没有任何一个数据库是全面的（即，包含所有结构也存在于其他数据库中）



The screenshot shows the ChemSpider search results for the molecular formula C₂₄H₂₂Cl₂N₄O₂. The interface includes tabs for 'MS Details', 'MSMS Details', and 'Compound Details'. The 'Compound Details' tab is active, displaying a list of 31 search results on the left and a detailed view of the top result on the right. The top result is 'N-[2-(4-Butylphenyl)-6-chloro-2H-benzotriazo-6-yl]-2,4-dichlorobenzamide', with its chemical structure shown. The composition is listed as C₂₄H₂₂Cl₂N₄O₂, Mass: 468.11.

母药代谢物拟合出的分子式
C₂₄H₂₂Cl₂N₄O₂：于Chemspider
上搜索出31个结构式，如何确认？

限制候选化合物的类别

根据目标化合物的类别去特定的数据库中检索可以限制候选化合物的结构式，比如使用特定的生物体数据库或化合物类别的数据库；例如，

代谢物数据库：HMDB (超过41 993种代谢物，2017年3月)

METLIN (超过24万个代谢物信息，其中12127个代谢物有高分辨二级图谱)

MassBank (超过19000张MS1谱图及28000张MS/MS谱图)

脂质数据库：Lipid Maps结构数据库 (40 360种脂质，2017年3月)

MSDIAL

天然产物数据库：KNAPSaCK、Reaxys、Natural Products Atlas(NP Atlas)

药物代谢数据库：DrugBank(包含10570个药物条目，版本5.0.11 2017-12 发布)

如果谱库检索有部分碎片吻合，母离子不同，可以根据谱库给出的化合物类型来缩小结构式类型

验证候选化合物 (Fragments Pane)

依据背景知识
缩减可能的
结构式范围

- 结合化合物的保留时间推测可能含有的化学键
- 若预期未知分析物在结构上与已知化合物有关。比如药物的降解产物和代谢物等。可通过与“母体”化合物具有相同的结构基序以及代谢过程中的生物转化途径，进行结构式的预测

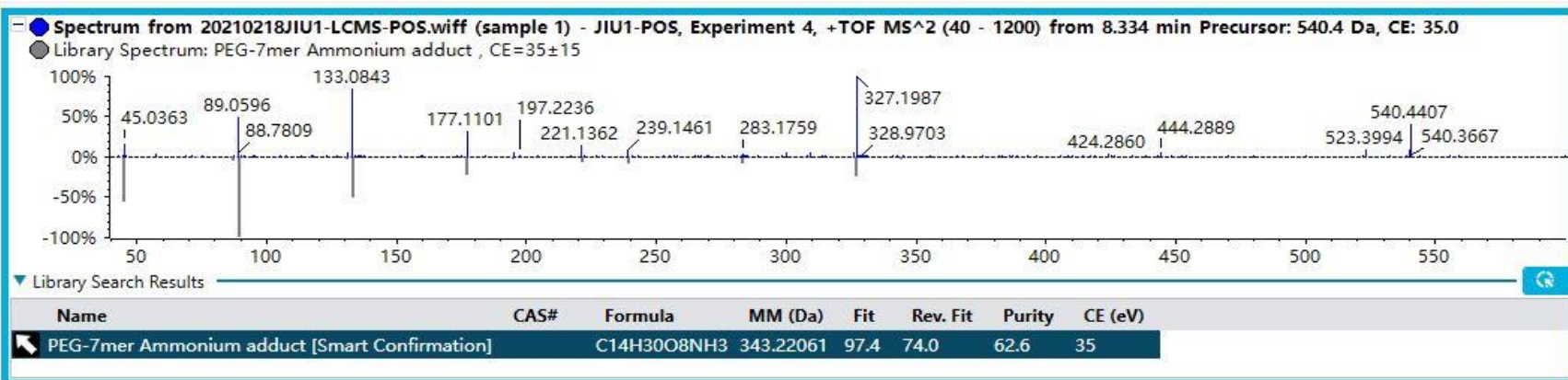
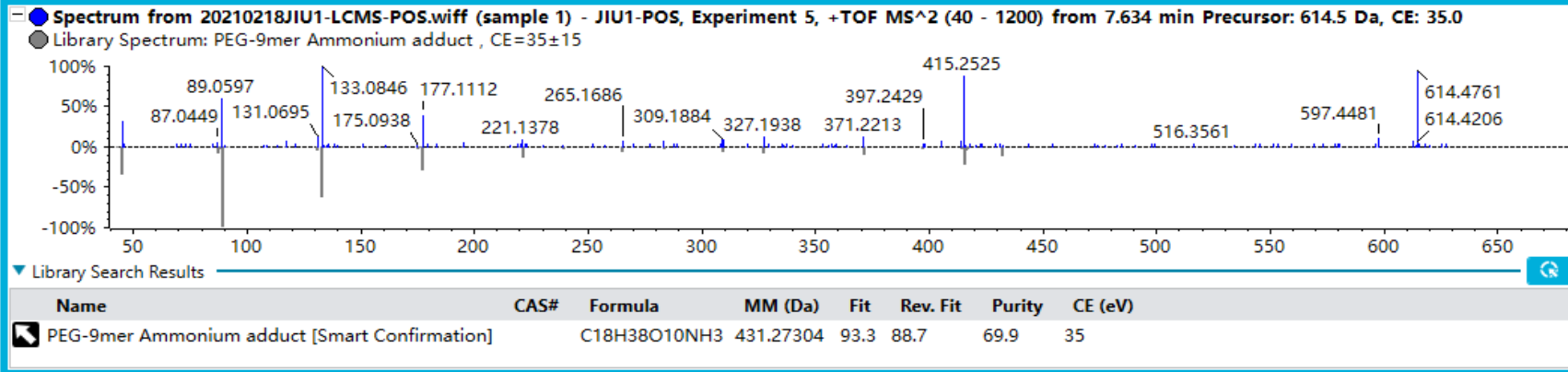
Fragment
Pane

- 将采集的谱图与潜在的候选结构可能产生的碎片进行比较，进行相似度分析。

碎片的合理
性分析

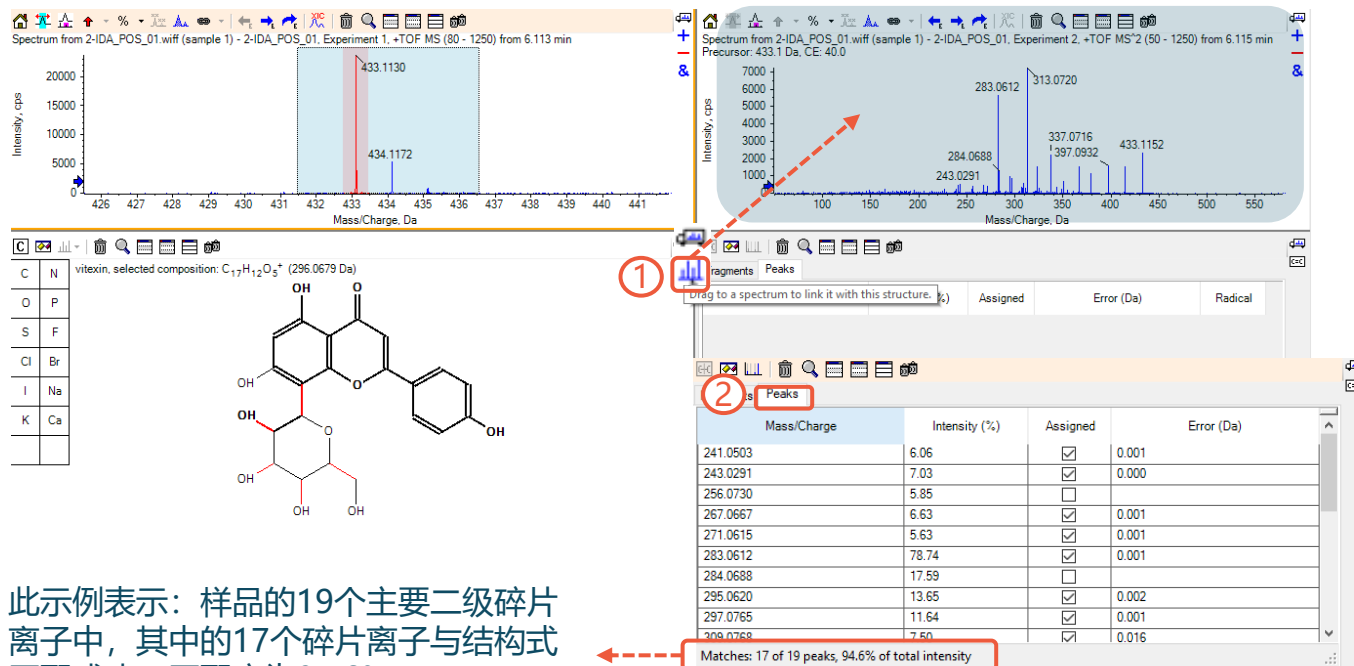
- 产物离子谱图主要碎片离子合理性分析，包括元素组成、氮规则和前体离子及其碎片的不饱和度（RDB/DBE）、合理的断键位置等

根据谱库检索得到的信息



关联Fragments Pane界面

关联PEAKS界面：点击结构式的右上角图标  (①)，左键拖拽至样品的二级谱图区域里，松开鼠标，则在Peaks界面 (②) 里会更新出样品的二级碎片质量数列表。



此示例表示：样品的19个主要二级碎片离子中，其中的17个碎片离子与结构式匹配成功，匹配度为94.6%。

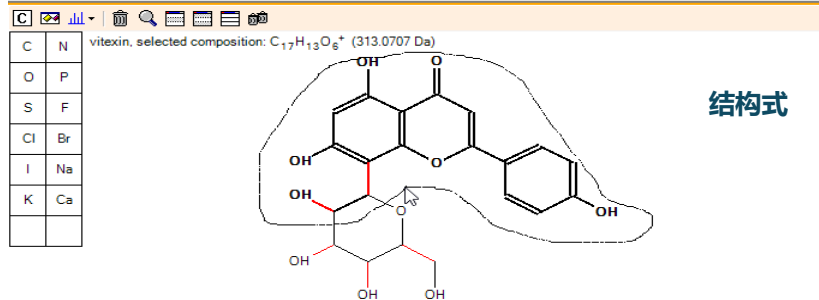
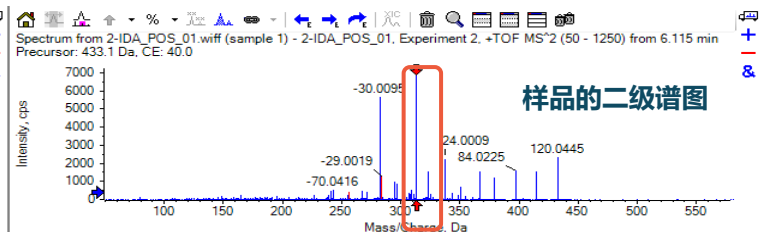
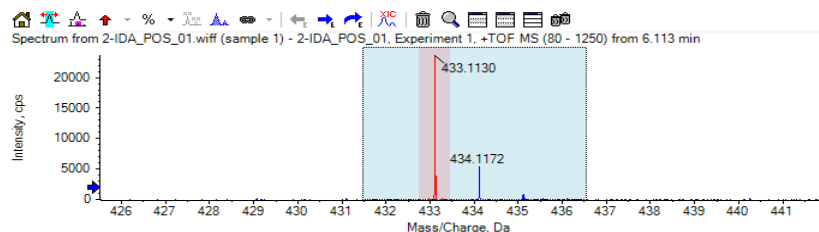
结构式的二级碎片解析说明

选中表里的一个碎片离子，如313.0720，则结构式里会自动黑色粗体高亮提示，表示相应的碎片离子结构归属；同时在样品的二级碎片质谱图里，会红色箭头自动标识此离子，其它碎片离子会自动显示为和此离子的差值关系。

样品二级谱图中，红色的碎片离子代表未和结构式匹配成功，蓝色的碎片离子代表在结构式中可以匹配成功。

也可以在结构式上直接左键拖拽，圈选中感兴趣的官能团，如果样品里也有此碎片，那么在样品的二级碎片质谱图里，红色箭头会自动标识到相应的质量数；

还可以左键单击标题，按照Intensity (%) 强度从大到小或从小到大排序；Assigned表示与结构式里官能团匹配的样品碎片离子。



结构式

Fragments			
Mass/Charge	Intensity (%)	Assigned	Error (Da)
243.0291	7.03	☒	0.000
267.0667	6.63	☒	0.001
271.0615	5.63	☒	0.001
283.0612	78.74	☒	0.001
295.0620	13.65	☒	0.002
297.0765	11.64	☒	0.001
309.0769	7.50	☒	0.010
313.0720	100.00	☒	0.001
323.0923	21.38	☒	0.016
337.0716	30.76	☒	0.016

Matches: 17 of 19 peaks, 94.6% of total intensity

FRAGMENTS PANE二级碎片解析 (无CHEMSPIDER)

- 1) 在Formula Finder里拟合出分子式后，可以将分子式复制 (①) 粘贴至ChemSpider官网里 (②)，网址为：www.chemspider.com，点击搜索 (③)，得到结构式信息。
- 2) 也可以进入其它网址或自定义结构式均可，确保化合物结构式为mol文件即可。
- 3) 导入结构式的mol文件
- 4) 关联Fragments Pane二级碎片解析
- 5) 还可以对已有结构式进行编辑及修改然后再适应二级碎片。

- 1. 不是所有的化合物都能被电喷雾电离（或者只在正模式或负模式下电离），不能电离的化合物在质谱中无响应。
- 2. 质谱信号分散在不同的同位素、加合物和/或碎片上。
- 3. 离子（加合物、碎片）的性质和丰度在很大程度上取决于样品溶剂和基质、仪器硬件、设置以及所用的总体实验条件。
- 4. 当化合物结构不稳定或所用实验条件不适合时，一级离子可能为源内诱导裂解后产生。
- 5. 未知物的结构鉴定通常不能仅通过MS的技术来实现，MS不能用于确定一些同分异构体。
- 6. 质谱中并非所有的峰都必须来自所感兴趣的化合物：可能来自于化学和非化学（噪声）背景的干扰。
- 7. 盐形态不能用ESI-MS进行解析。

- 参考文献
- 常见的碎片，谱图的地形地貌
- 通过对已知化合物所得谱图的分析，进而推测其谱图裂解途径。
- 通过对未知化合物所得谱图分析，进而解析出化合物的结构。

所有离子的裂解反应，都必须遵从有机反应规律

1

Charge retention fragmentations (CRF) 电荷保留裂解

- 1.1 Remote hydrogen rearrangements
- 1.2 Retro-Diels–Alder (RDA) reactions
- 1.3 Retro-ene reactions
- 1.4 Retro-heteroene reactions
- 1.5 Charge remote fragmentations

2

Charge migration fragmentations (CMF) 电荷转移裂解

- 2.1 POS CMF
 - 2.1.1 Simple inductive cleavages
 - 2.1.2 Inductive cleavages assisted by adjacent heteroatoms
 - 2.1.3 Displacement reactions
 - 2.1.4 Inductive cleavages assisted by β -hydrogen removal
 - 2.1.5 Grob–Wharton fragmentation
- 2.2 NEG CMF
 - 2.2.1 α -Eliminations
 - 2.2.2 γ - and ϵ -eliminations
 - 2.2.3 Displacement reactions
 - 2.2.4 Eliminations assisted by β -hydrogen removal

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-11-14788-ZH-A

