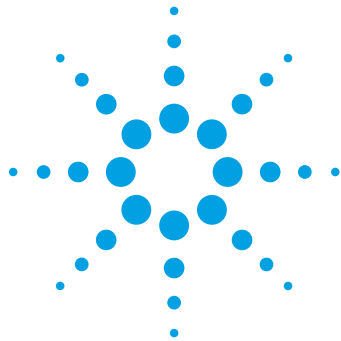




All Ions MS/MS: скрининг и количественное определение целевых веществ с помощью времяпролетных и квадрупольно-времяпролетных систем для ВЭЖХ-МС компании Agilent

Технический обзор

Введение

Методика All Ions MS/MS доступна на времяпролетных и квадрупольно-времяпролетных приборах компании Agilent с высоким разрешением. В рамках этой методики для идентификации соединений используются собственные персональные библиотеки точных масс компании Agilent (PCDL) со сведениями о молекулярных и фрагментных ионах. Библиотеки PCDL с богатым информационным наполнением включают сведения о точно измеренных массах тысяч соединений. Внедрение инструментальных средств обработки All Ions MS/MS в ПО MassHunter обеспечивает точную идентификацию соединений с возможностью удобного просмотра. В результате алгоритм All Ions MS/MS позволяет уменьшить время, затрачиваемое на настройку методик, улучшить производительность и осуществлять достоверный высокочувствительный количественный и качественный анализ на одном приборе, в одном аналитическом цикле.



Agilent Technologies

Идентификация посредством корреляции между ионами-предшественниками и фрагментными ионами

В методике All Ions MS/MS сбор данных по точно измеренным массам с высоким разрешением (HRAM) осуществляется при разных условиях: (1) при низком значении напряжения на фрагментационной ячейке или энергии соударений и (2) одном или нескольких высоких значениях энергии. Низкоэнергетические спектры преимущественно отображают только молекулярные ионы (или ионы-предшественники) соединений, тогда как высокоэнергетические – ионы-предшественники и их фрагментные ионы.

Этот аналитический метод легко настраивается с помощью ПО MassHunter Workstation Acquisition для времяпролетных и квадрупольно-времяпролетных приборов (начиная с версии B.05.01). На рис. 1 показана новая возможность в ПО для сбора данных, поле Experiment #, в котором допускается использование разных значений параметров в рамках одного временного сегмента. Например, можно настроить для эксперимента 1 энергию соударений 0 В, а для экспериментов 2 и 3 энергии соударений – 20 и 40 В соответственно.

При изменении напряжения на фрагментационной ячейке или энергии соударений создается файл данных с низкоэнергетическим каналом, который содержит преимущественно ионы-предшественники, и одним или несколькими высокоэнергетическими каналами, которые содержат ионы-предшественники и фрагментные ионы. На рис. 2А показан спектр симазина с энергией соударения 0 В, в котором присутствует заметный пик иона-предшественника при 202,08584. На рис. 2В изображен усредненный спектр с энергиями 20 и 40 В, который содержит ион-предшественник и несколько фрагментных ионов.

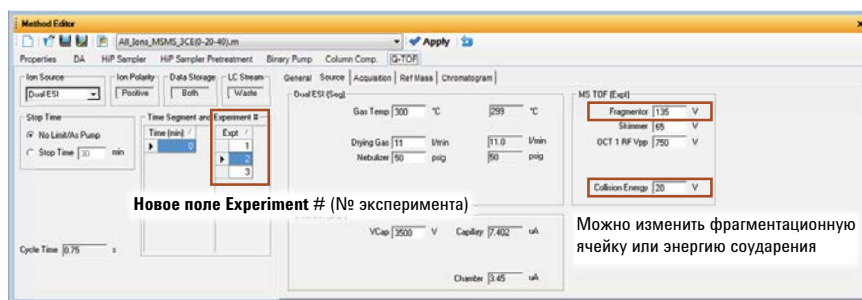


Рис. 1. Вкладка Q-TOF (Квадрупольный времяпролетный) в редакторе методов MassHunter Acquisition. В рамках одного временного сегмента можно настроить до четырех экспериментов с разными значениями энергии соударения (для квадрупольного времяпролетного МС) или напряжения на фрагментационной ячейке (для времяпролетного или квадрупольного времяпролетного МС).

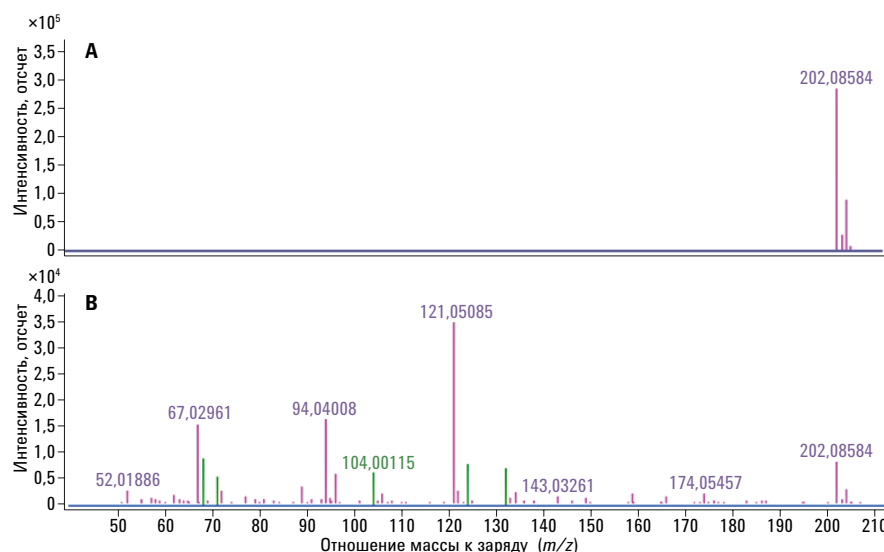


Рис. 2. А) Ион-предшественник и его изотопный кластер для гербицида симазина выделен красным цветом. В) Средние значения спектров, полученных при энергиях соударения 20 и 40 В. Предшественник с m/z 202,08584 присутствует, но получены также данные для фрагментных ионов.

Режим All Ions MS/MS в ПО MassHunter Qualitative Analysis выполняет корреляцию между профилем элюирования иона-предшественника в низкоэнергетическом канале и фрагментами, созданными при более высоких энергиях. Например, на рис. 3 показан предшественник (красным) и фрагмент со значением m/z 132,03221 с квалифицирующим созюированием (зеленым). Это достигается путем получения всех сведений о фрагментах в библиотеке Agilent PCDL, которая содержит MC-МС спектры, полученные при разных значениях энергии соударений¹. Кроме того, библиотеки PCDL содержат сведения о соединении, включая его название, формулу, точно измеренную массу, структуру и идентификаторы базы данных, например номер CAS. Библиотека PCDL используется для выбора возможных фрагментных ионов, для которых затем анализируется созюирование с ионом-предшественником.

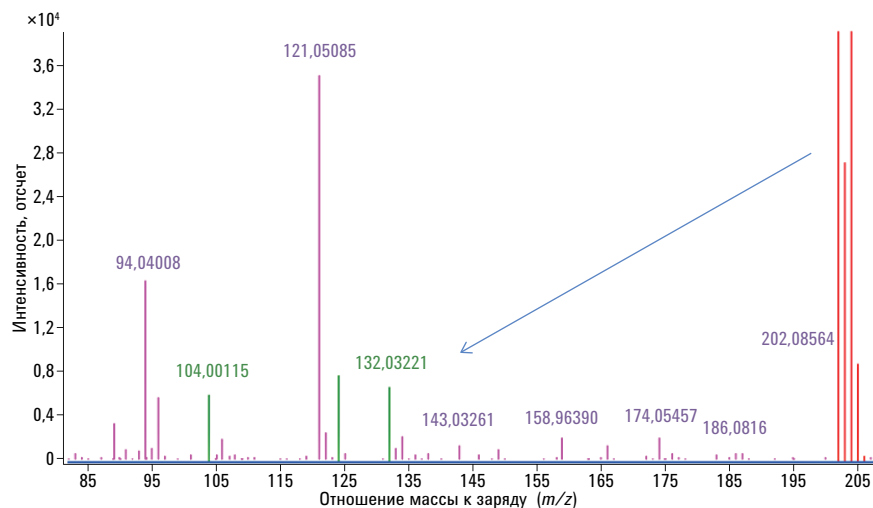
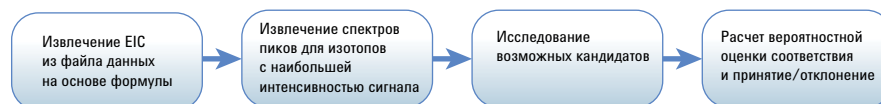


Рис. 3. Ион-предшественник симазина с m/z 202,08564 (красный) коррелирует с фрагментным ионом m/z 132,03221 (зеленый) с использованием алгоритма All Ions MS/MS.



Поиск по формуле

Методика All Ions MS/MS (рис. 4) является расширением уникального алгоритма поиска по формуле (Find by Formula или FBF) в ПО MassHunter Qualitative Analysis. Алгоритм поиска по формуле использует в качестве отправной точки формулу соединения (например, из PCDL) и рассчитывает моноизотропную массу и соотношение изобарных пиков. Затем из файла данных на основе наиболее распространенных изотопов извлекаются хроматограммы по выделенному иону (EIC) для каждого выбранного носителя заряда и средние спектры из первых 50 % проинтегрированных пиков. Таким образом, если соединение присутствует в файле данных, оно должно отображаться в виде хроматографического пика для каждого из своих основных молекулярных ионов.

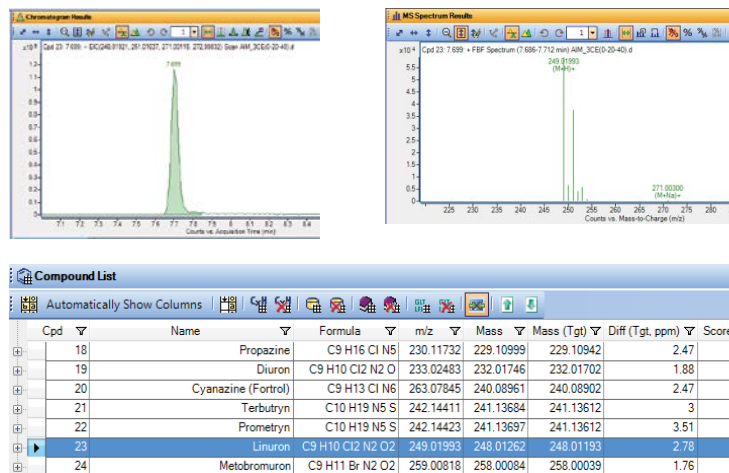


Рис. 4. При работе с функцией Find by Formula формула используется для расчета моноизотропной массы и соответствующих изотопов для всех выбранных носителей заряда, извлечения EIC и последующего получения спектров для хроматографических пиков. Затем в спектрах пиков выполняется поиск ионов, связанных с каждым соединением, и им присваивается вероятностная оценка соответствия. Соединения, превышающие заданный пользователем порог, помечаются в программе MassHunter Qualitative Analysis как идентифицированные.

Извлеченные из пика масс-спектры исследуются для обнаружения возможных кандидатов на основе брутто-формулы соединения. Для каждого кандидата рассчитывается вероятностная оценка соответствия на основе его массы, соотношение изобарных пиков и интервала между ними (рис. 5). Если соединение проходит фильтр по оценке соответствия, оно помечается как идентифицированное. Алгоритм поиска по формуле является быстрым и может проверять файл данных по базам данных точно измеренных масс (CSV, PCD или PCDL), которые содержат тысячи формул, за несколько минут.

Подтверждение фрагмента

В методике All Ions MS/MS алгоритм поиска по формуле усовершенствован благодаря дополнительному шагу подтверждения фрагмента с использованием одного или нескольких высокоэнергетических каналов. Если для соединения существует хотя бы один спектр МС-МС в библиотеке PCDL, наиболее распространенные ионы-продукты в библиотечных спектрах извлекаются в виде EIC из соответствующего высокоэнергетического канала. Например, на рис. 6А показан библиотечный спектр МС-МС симазина при энергии соударения 20 В из библиотеки пестицидов PCDL. На рис. 6В приведен высокоэнергетический спектр пробы, которая содержит симазин. Используя библиотеку PCDL, программе удалось определить фрагменты при значениях m/z 104,00 и 132,03, несмотря на наличие посторонних ионов с большей интенсивностью сигнала при m/z 94,04 и 121,05.

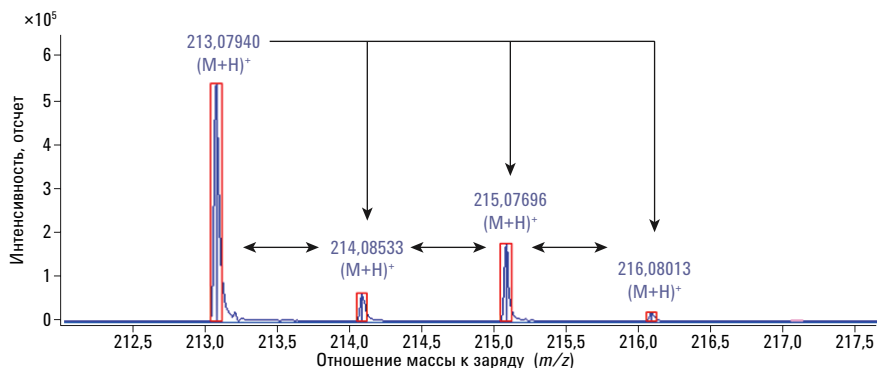


Рис. 5. При идентификации соединения с помощью алгоритма FBF используются три характеристики изотопного кластера иона-предшественника: точно измеренная масса каждого изотопа, его интенсивность (выделены красными прямоугольниками) и интервалы относительно других изотопов.

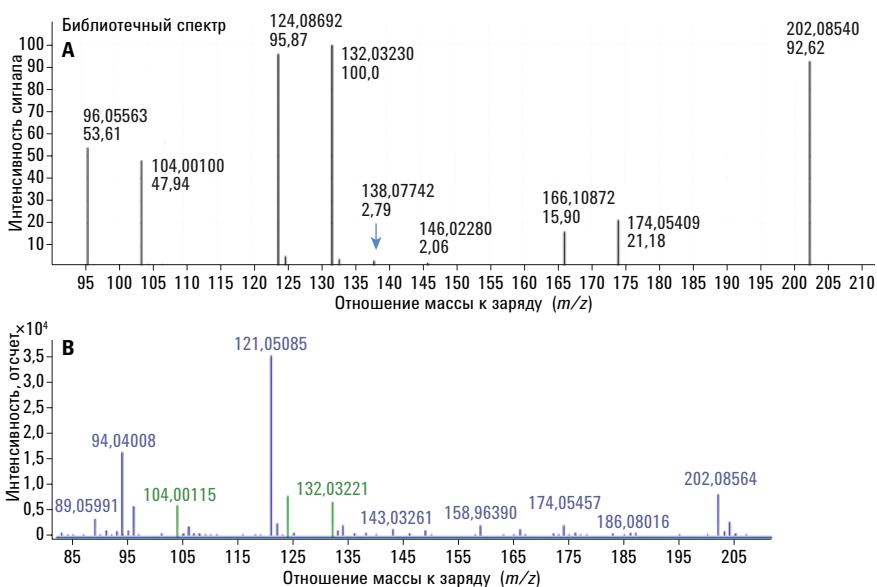


Рис. 6. А) Библиотечный МС-МС спектр, полученный при энергии соударения 20 В. Он показывает ионы-продукты для соединения, включая m/z 104,00 и 132,03. Эти ионы видны (показаны зеленым цветом) на нижнем спектре (В) в высокоэнергетическом канале, несмотря на ионы с более высокой интенсивностью при m/z 94,04 и 121,05.

Фрагменты из спектров МС-МС в библиотеке PCDL извлекаются в виде EIC и налагаются на EIC иона-предшественника. Если в библиотеке PCDL отсутствуют МС-МС спектры для соединения, извлекаются и налагаются EIC для наиболее распространенных фрагментов в среднем всех спектров высокоэнергетического канала. Эти наложенные EIC оцениваются с использованием уникального параметра оценки коэффициента соэлюирования. Оценка соэлюирования рассчитывается по методике, аналогичной чистоте пика², используемой в УФ-хроматографии, в которой программа рассчитывает значение на основе интенсивности, формы (симметричности), ширины пика и времени удерживания. Нормализованное отношение интенсивностей фрагментных ионов и иона-предшественника отображается на графике соэлюирования поверх времени удерживания и доступно для просмотра пользователем. На рис. 7А показаны наложенные EIC для симазина, а на рис. 7В — график совместного элюирования со всеми ионами для одной вершины (5,571 мин).

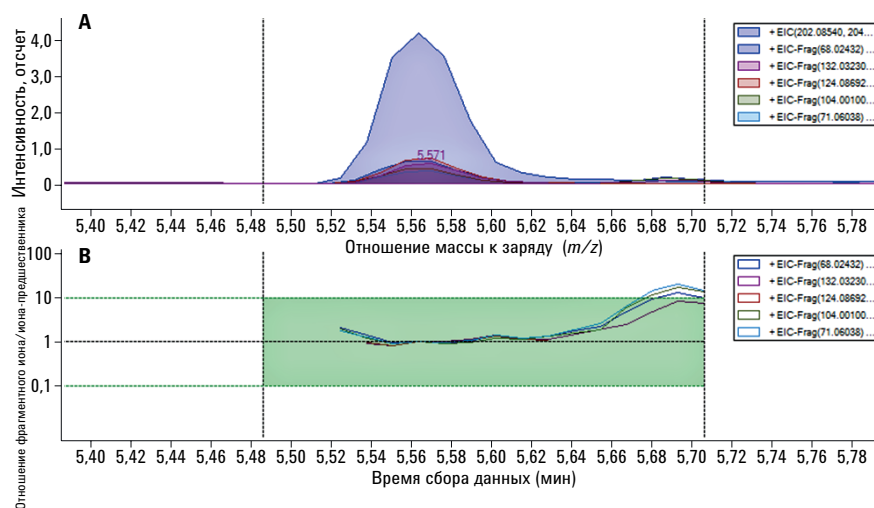


Рис. 7. А) EIC для симазина с ионом-предшественником, выделенным синим цветом, и фрагментными ионами, обозначенными другими цветами. Все ионы имеют одинаковую хроматографическую вершину. В) График коэлюирования для симазина, на котором показано отношение нормализованной интенсивности фрагментных ионов к интенсивности иона-предшественника в течение времени удерживания. Фрагментные ионы демонстрируют отношения, приблизительно равные 1 в середине пика предшественника, что свидетельствует о совместном соэлюировании всех ионов. Это подтверждает идентификацию симазина в пробе.

Для настройки параметров алгоритма работы All Ions MS/MS используется новая вкладка Fragment Confirmation (Подтверждение фрагмента) в области подтверждения по формуле в программе MassHunter Qualitative Analysis (рис. 8). На этой вкладке можно указать, какой спектр следует использовать, библиотечный или средний по фрагментам, и сколько наиболее распространенных ионов требуется извлекать. Можно также установить пределы для EIC фрагментных ионов на основе различий во времени удерживания, минимального соотношения «сигнал — шум» и коэффициента соэлюирования.

После завершения работы функции Find by Formula с подтверждением фрагментов можно просмотреть результаты для каждого соединения на панели результатов идентификации соединений (рис. 9). Сверху отображается название соединения, его химическая формула и оценка вероятностного соответствия из FBF. Ниже перечислены отдельные фрагментные ионы, используемые для идентификации, с оценкой соэлюирования, энергией соударения и указанием того, квалифицирован ли фрагмент. Если фрагмент не квалифицирован, приводится причина, например низкое соотношение «сигнал — шум».

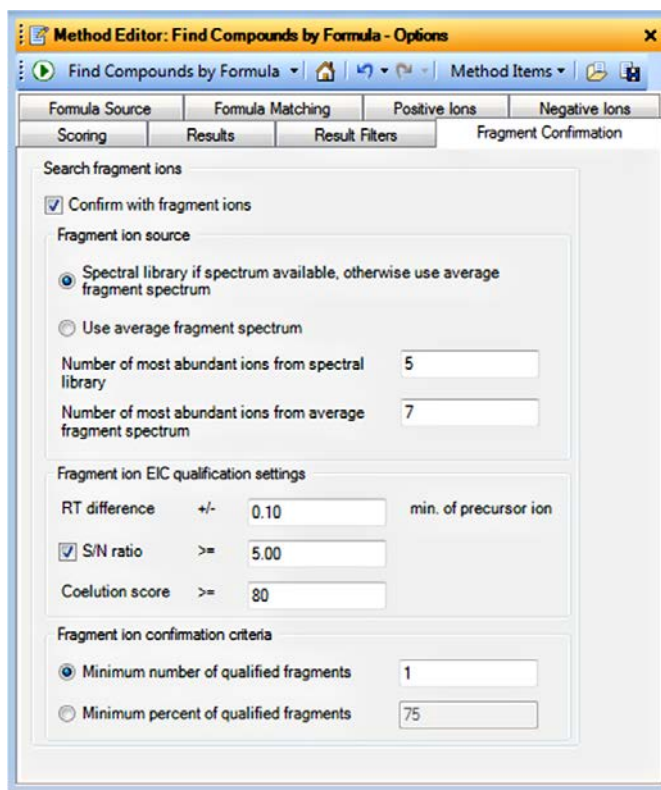


Рис. 8. Выберите вкладку **Fragment Confirmation (Подтверждение фрагмента)** в области поиска по формуле в программе MassHunter Qualitative Analysis. Щелкните **Confirm with fragment ions (Подтвердить с использованием фрагментных ионов)** для изменения поиска по формуле, чтобы запустить алгоритм All Ions MS/MS. Пользователи могут выбрать подтверждение с использованием спектральной библиотеки (PCDL) или по ионам с наибольшей интенсивностью из усредненного спектра фрагментов. Кроме того, можно определить число используемых ионов и задать пределы для квалификации EIC, а также минимальное количество квалифицированных фрагментов для подтверждения идентификации соединения.

Compound Identification Results: Cpd 27: 7.932 Chloroxuron; C15 H15 Cl N2 O2											
Automatically Show Columns											
ID Techniques Applied											
FBF											
Best	Name	Formula	Score	m/z	Mass	Mass (MFG)	Mass (Tgt)	Diff (ppm)	Diff (mDa)	Score (Tgt)	RT
1	Chloroxuron	C15 H15 Cl N2 O2	97.5	291.09049 313.07207	290.08322		290.08221	-3.49	-1.01	97.5	7.932
Coelution Score	CE	Flags(FIs)	Height	m/z	Compound Name	RT	RT Diff	SNR			
99.4	20	Qualified	495535.9	72.04488	Chloroxuron	7.926	0.006	178.3			
		EIC with zero abund		46.06513	Chloroxuron						
		Low S/N ratio	844.9	73.05222	Chloroxuron	7.965	0.032	2.4			
99.6	20	Qualified	12832.4	218.03623	Chloroxuron	7.926	0.006	Infinity			
98.9	20	Qualified	16211	164.09441	Chloroxuron	7.926	0.006	Infinity			

Рис. 9. Результаты идентификации соединения для хлороксурина. В первой строке таблицы указано лучшее совпадение для соединения с его названием, формулой и вероятностной оценкой соответствия, полученной по результатам работы функции Find by Formula. В нижней таблице показано, что было оценено пять фрагментных ионов с оценкой соэлюирования, энергиями соударения и результатами квалификации. Три фрагментных иона были квалифицированы и два отклонены с указанием причины.

Просмотр сведений о соединении

Можно быстро проверить результаты работы алгоритма All Ions MS/MS в новом представлении сведений о соединениях (рис. 10). Для просмотра всех соединений имеется возможность прокрутки списка. Также можно оперативно просматривать результаты совпадения в библиотеке, MS- и фрагментные спектры, наложенные ЕИС и графики созлуживания.

К этому моменту пользователи разработают методы качественного анализа для идентификации соединений с использованием методики All Ions MS/MS. Они могут продолжить анализ проб без необходимости доступа к MS-MS спектрам в библиотеке PCDL, поскольку сведения о фрагментных ионах сохраняются в методе MassHunter Qualitative Analysis. В скрининг можно легко добавить новые соединения,

дополнив PCDL и выполнив повторную обработку данных. Эта полезная опция позволяет выполнять последующие повторные запросы данных без повторного анализа пробы.

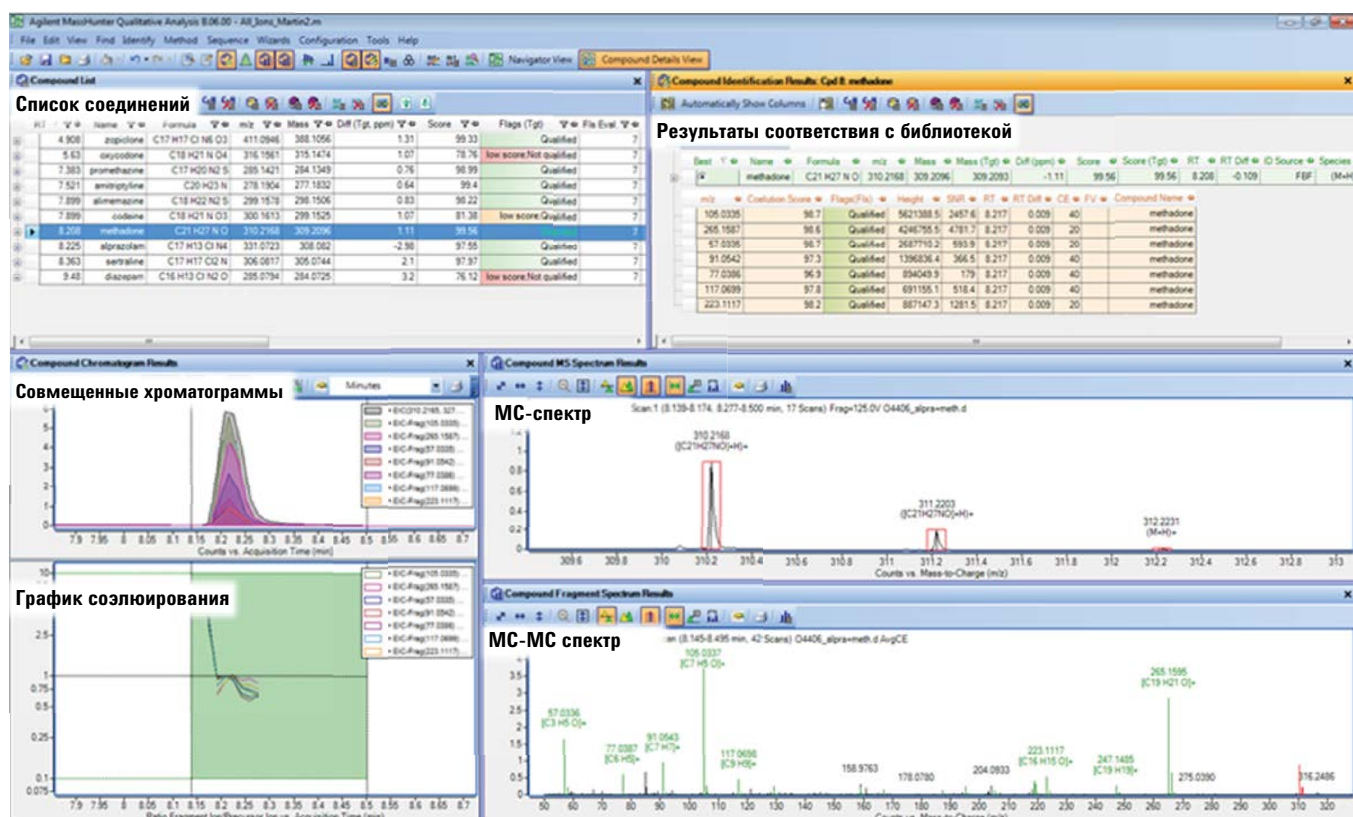


Рис. 10. Выбрав **Compound Details View** (Представление сведений о соединениях) в программе MassHunter Qualitative Analysis, пользователи могут быстро и эффективно просмотреть результаты работы All Ions MS/MS. Начав сверху списка соединений, они могут перемещаться от соединения к соединению для подтверждения результатов и просмотра сведений об отклоненных соединениях.

Количественный анализ

После просмотра представления сведений о соединениях можно экспортировать данные в ПО MassHunter Quantitative Analysis в файле с форматом CEF (Compound Exchange Format). Файл CEF содержит сведения, необходимые для настройки количественного метода: название соединения, время удерживания, ион-предшественник, фрагментные ионы (для создания квалифицирующих ионов), энергия соударения и относительные интенсивности. Это значительно ускоряет создание метода обработки количественных данных. ПО MassHunter Quantitative Analysis позволяет автоматически выбирать основные ионы-предшественники и фрагментные ионы для каждого соединения с относительной интенсивностью выше 10 %, упрощая трудоемкую обработку вручную. Программа может использовать фрагментные ионы с разными энергиями соударения или напряжениями на

фрагментационной ячейке (рис. 11). Можно также использовать в качестве квалифицирующего иона один из изотопов иона-предшественника из низкоэнергетического канала (см. ион-продукт при m/z 204,0828 на рис. 11).

Программа количественного анализа извлекает хроматограммы для основного целевого иона (квантификатор), по которому будет проводиться количественная оценка, ионов-квалификаторов и изотопного кластера молекулярного иона. Можно проверить изотопные вариации, просмотрев их наложение на теоретический шаблон (рис. 12).

Quantifier					
Name	TS	Transition	Scan	Type	Uncertainty
Simazine	1	202.0858	Ms1Scan	Target	Relative
Qualifier					
Product Ion	Collision Energy	Rel. Resp.	Uncertainty	Area Sum	
124.0869	20.0	20.7	20.0		
68.0243	40.0	21.6	20.0		
204.0828	0.0	31.1	20.0		

Рис. 11. Настройка метода в программе Agilent MassHunter Quantitative Analysis. Импортимые сведения о соединении содержат его название, ион-предшественник, ионы-продукты и относительный коэффициент отклика. Следует отметить, что для квалификаторов применяются разные энергии соударения, обеспечивая дополнительную гибкость для используемых ионов. Ион при m/z 204,828 с энергией соударения 0 В является изотопом иона-предшественника и используется как квалификатор для дальнейшего подтверждения.

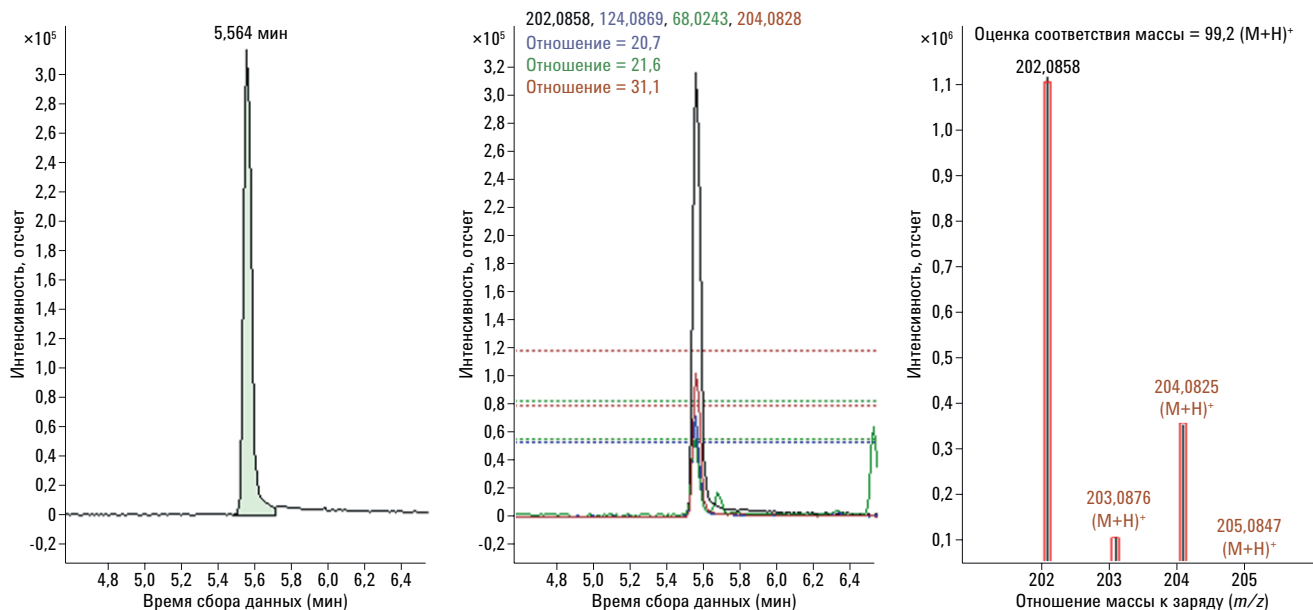


Рис. 12. Хроматограммы по выделенному иону для иона-квантификатора (целевого иона), квалификаторов и изотопного кластера молекулярного иона. Теоретический шаблон относительного изотопного состава обозначен красными прямоугольниками.

Выводы

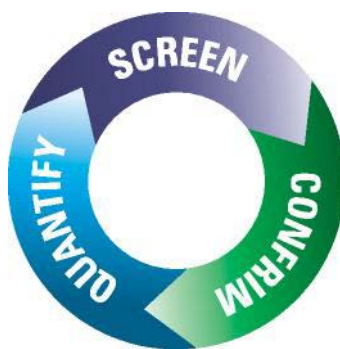
All Ions MS/MS — это новый революционный способ обработки масс-спектральных данных, который сводит к минимуму ошибки пользователя при проведении качественных и количественных измерений. Этот рабочий процесс намного быстрее настройки количественных анализов с использованием ВЭЖХ-МС/МС систем с тройным квадруполом, для которой требуется многочасовой ввод сведений о соединениях и выбор ионов-квалификаторов с высокой интенсивностью. All Ions MS/MS — это удобный и надежный алгоритм для повседневной работы при проведении идентификации соединений, который не требует повторных измерений, поскольку данные сканирования всегда под рукой. All Ions MS/MS — это уникальный метод, позволяющий проводить на масс-спектрометре высокого разрешения как качественный, так и количественный анализ в рамках одного эксперимента, выполнив всего один ввод образца.

Литература

1. Руководство по быстрому запуску диспетчера базы данных персональных соединений и библиотеки точных масс для MassHunter, номер публикации G3336-90014, февраль **2011**.
2. Hans-Jürgen P. Sievert, Anton C.J.H. Drouen, «Spectral matching and peak purity in Diode Array Detection in High Performance Liquid Chromatography», New York: Marcel Dekker, **1993**.

Дополнительные сведения

- 5991-2295EN (5991-2295RU) — Указания по применению All Ions MS/MS для пестицидов
- 5991-2295EN (5991-2295RU) — Указания по применению All Ions MS/MS для судебной медицины
- Руководство по рабочему процессу All Ions MS/MS



www.agilent.com/chem

Настоящая информация предназначена только для использования в ходе исследований.

Не для использования при диагностических процедурах. Информация, описания и технические характеристики в настоящем документе могут быть изменены без предупреждения.

Компания Agilent Technologies не несет ответственности за возможные ошибки в настоящем документе, а также за убытки, связанные или являющиеся следствием получения настоящего документа, ознакомления с ним и его использования.

Информация может быть изменена без предупреждения.

© Agilent Technologies, Inc., 2013.
Напечатано в США 10 июня 2013 г.
5991-2465RU



Agilent Technologies