

Q-RAI 结合 MS-DIAL 5：实现天然产物 高效、灵敏和准确的数据非依赖型 采集与解析

作者

于擎
安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本研究基于 Agilent Revident Q-TOF 的 Q-RAI（四级杆分辨全离子）采集模式，结合 MS-DIAL 5 的数据解析流程，建立了一种高效分析天然产物的方法。该分析方法可生成高质量的数据非依赖型采集 (DIA) 谱图，并利用先进的二级解卷积算法实现混合 MS/MS 谱图的精准解析与谱库匹配，显著提升天然产物鉴定的通量、准确性和覆盖范围。

前言

目前，在依赖液质联用技术的非靶向分析应用中，主流的数据采集方法主要分为两类：数据依赖型采集（DDA 或 auto MS/MS）和数据非依赖型采集 (DIA)。与 auto MS/MS 相比，DIA 的核心优势在于能够获取更全面的信息，因为该模式可确保获得所有母离子（包括低丰度离子）的碎片谱图。

在安捷伦高分辨液质联用系统（Agilent 6546 和 Agilent Revident）中，DIA 技术可进一步细分为两种模式：第一种是全离子模式 (All Ions)，其特点是所有离子不经任何筛选直接进入碰撞池中进行碎裂；第二种是四极杆分辨全离子模式 (Quadrupole Resolved All Ions, Q-RAI)，这是一种兼具高分辨率、高质量精确度和高覆盖度的非靶向 DIA 采集模式，能够全面收集被电离化合物的母离子及其碎片信息。

Q-RAI 的采集循环包含一个覆盖全扫描范围的 MS1 谱图（例如 m/z 100–1100），其后跟随一系列覆盖不同质量范围且施加相同或不同碰撞能量的宽带隔离窗口（例如 m/z 50–150, CE 19； m/z 149–200, CE 21，依此类推）。其关键特性在于，所产生的碎片谱图仅来源于相应隔离窗口内的母离子。因此，Q-RAI 能够提供显著简化且归属相对明确的碎片谱图，与 All Ions 模式下产生的复杂的混合谱图形成鲜明对比。Q-RAI 能够为每个母离子提供高分辨率、高质量精确度的 MS/MS 谱图，从而显著提升未知化合物鉴定结果的可靠性。

本应用简报介绍了使用 Agilent Revident Q-TOF 的 Q-RAI 采集模式，对不同品种辣椒提取物样本进行数据采集的实例。采集得到的数据通过 MS-DIAL 5^[1] 进行处理，其核心步骤包括二级解卷积和谱库匹配分析。与 auto MS/MS 方法相比，Q-RAI 的参数配置更简洁、高效。同时，MS-DIAL 5 软件的二级解卷积功能与 Q-RAI 数据高度兼容，有效提升了数据分析过程的通用性与操作便捷性。

实验部分

试剂和样品

甲醇为液质级，购于 Merck；甲酸为液质级，购于 Sigma；所用实验用水为 Millipore Milli-Q 超纯水系统现制备的高纯去离子水；五个不同品种的辣椒提取物由合作用户提供。

仪器和设备

采用 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 与 Agilent Revident Q-TOF 联用系统，配备安捷伦双喷射流离子源 (AJS)。

液相色谱条件

色谱柱：Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm（部件号 959758-902）
流速：0.3 mL/min
柱温：40 °C
流动相 A：0.1% 甲酸水溶液
流动相 B：0.1% 甲酸甲醇溶液
进样体积：5 μL
后运行时间：5 min
梯度洗脱程序：

时间 (min)	B (%)
0	5
1	5
12	100
17	100

质谱条件

极性：正离子模式
毛细管电压：3.5 kV
干燥气温度：250 °C
干燥气流速：8 L/min
雾化气压力：35 psi
鞘流气温度：350 °C
鞘流气流速：11 L/min
喷嘴电压：0 V
碎裂器电压：135 V
MS1 采集范围： m/z 50–1100
MS1 采集速率：10 谱图/秒
MS2 采集范围： m/z 50–1100
MS2 采集速率：12 谱图/秒
Q-RAI 隔离窗口设置：

On	起始	结束	窗口宽度	碰撞能量
TRUE	50	150	100	19
TRUE	149	200	51	21
TRUE	199	250	51	23
TRUE	249	300	51	25
TRUE	299	350	51	26
TRUE	349	400	51	28
TRUE	399	499	100	31
TRUE	498	598	100	34
TRUE	597	697	100	38
TRUE	696	1100	404	47

软件

使用 MassHunter LC/MS Data Acquisition version 12 for Revident LC/Q-TOF 进行数据采集；

使用 MassHunter 定性分析软件 12 对原始数据进行初步评估；

使用 MS-DIAL v5.5.250627 对 Q-RAI 数据进行二级解卷积和谱库匹配。

结果与讨论

Q-RAI 方法设置

为获得高质量的 Q-RAI 数据，需要对扫描速度进行优化。其核心目标是确保采集到充足的数据点数量，使每个离子通道（包括母离子和碎片离子）都能形成峰形良好、可准确积分的色谱峰。

鉴于 Q-RAI 方法通常涉及设置多个采集窗口，并且需要兼顾仪器灵敏度，MassHunter LC/MS Data Acquisition 12 中特别集成了方法开发辅助计算器。该计算器根据输入的关键参数（例如，预估的平均色谱峰宽、计划使用的窗口数量等），能够智能评估当前的扫描速度参数设置与窗口数量配置是否匹配。如图 1 所示，该工具可直观地显示 MS1 和 MS2 扫描的分布情况，并计算出基于当前的参数设置，化合物色谱峰预计可获取的平均数据点数量。此功能显著提升了 Q-RAI 方法的开发效率，可帮助开发者更便捷地平衡采集速度与灵敏度之间的关系。

在本研究的辣椒提取物分析中，考虑到绝大多数化合物分子量集中在 m/z 500 以下，因此将最后一个隔离窗口特别设置为宽窗口 (m/z 696–1100)。此设置的目的是有效减少所需的总隔离窗口数量，从而优化整体采集频率。

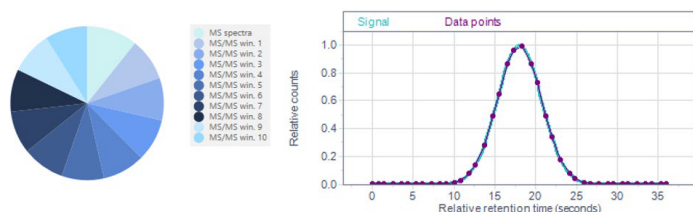


图 1. MS/MS 方法开发辅助计算器

MS-DIAL 关键参数设置

数据导入

MS-DIAL 5 原生支持安捷伦高分辨质谱原始数据格式，可直接处理数据文件，免除格式转换步骤。需要特别注意的是，安捷伦液质联用仪器生成的原始数据存储在带有 .d 后缀的专用文件夹中（例如 Sample001.d、Sample002.d 等）。

正确的导入步骤如下：

- 在文件资源管理器中，选中所有需要分析的 .d 文件夹
- 将这批 .d 文件夹整体拖拽至 MS-DIAL 5 软件的文件导入界面区域（注：直接使用软件内的浏览功能通常无法正确识别 .d 格式）
- 软件确认导入后，在参数设置中选择 SWATH 作为数据类型
- 点击 Set to all 按钮，MS-DIAL 5 将自动识别所有数据源自 Q-RAI 模式，并完成对应的采集参数配置（操作界面见图 2）

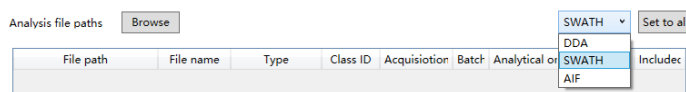


图 2. MS-DIAL 5 支持的数据类型及选择正确的数据类型

二级解卷积参数设置

与 auto MS/MS 或 Targeted MS/MS 模式不同，Q-RAI 采用宽隔离窗口设计，在单个采集窗口内通常有多个母离子同时进入碰撞池中碎裂，导致采集到的二级谱图 (MS/MS) 实际上是由多个母离子产生的碎片离子混合而成的复合谱图。

为了从这种复合谱图中有效提取单一化合物对应的相对纯净的 MS/MS 谱图，必须应用二级谱图解卷积算法。该算法基于同一化合物母离子及其碎片离子之间固有的色谱共洗脱行为（即它们在色谱图中具有一致的峰形和保留时间），对混合 MS/MS 数据进行分离与归属。

在 MS-DIAL 5 中，解卷积功能位于 Spectrum deconvolution 标签下。用户可通过调整 Sigma window value 参数（见图 3）精细控制解卷积过程的严格程度，从而影响输出谱图的质量：

- 较低值范围（典型参数范围：0.1–0.5）：对母离子与碎片离子间色谱峰共洗脱相关性的要求较低。可能导致解卷积后的谱图中保留更多无关离子信号（背景噪音）
- 较高值范围（典型参数范围：0.5–1.0）：显著提高对色谱峰共洗脱相关性的要求。虽然能有效抑制背景噪音，使谱图更洁净，但也可能牺牲某些低丰度碎片离子的信号

因此，Sigma window value 参数的设定需根据样本复杂度和分析目标进行优化，在谱图纯净度（噪音抑制）与碎片离子信息完整性之间寻求最佳平衡。

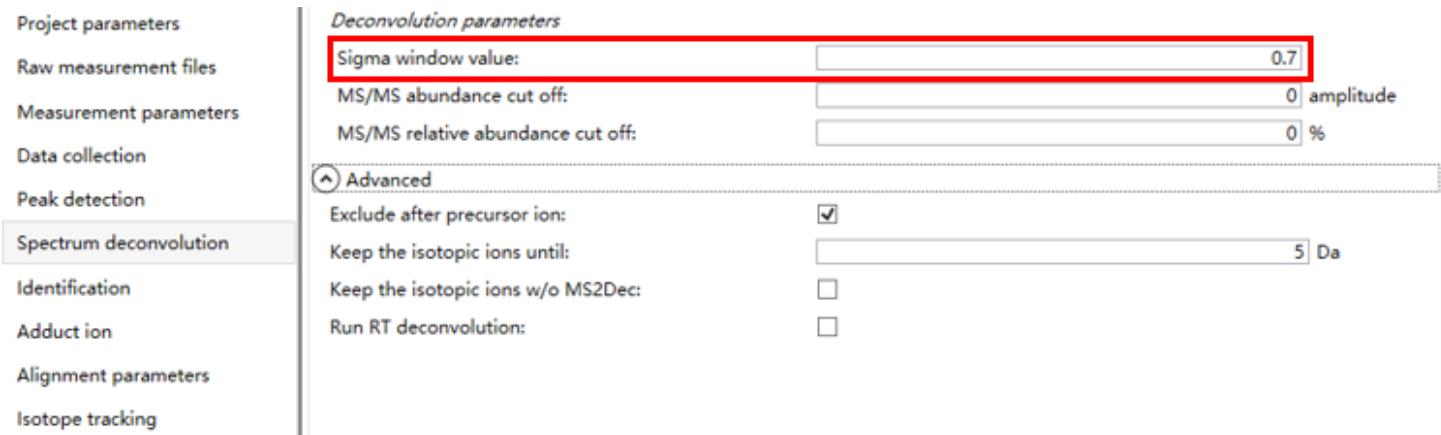


图 3. 二级解卷积相关设置

辣椒提取物分析结果的初步探索

辣椒提取物样本的非靶向分析整体结果汇总于图 4（Alignment spot viewer 视图）中，图中每个数据点代表一个经 MS-DIAL 5 成功鉴定的色谱特征。本次分析共鉴定出 1260 个化合物，此数值包含因色谱扩散或背景干扰等因素导致的重复鉴定特征。

分析结果与方法开发阶段的预期高度吻合。如图 4 所示，在 m/z 500 以上的高质量数区域（化合物密度较低）鉴定出的特征数量显著较少。这一分布特征有力证实了将最后一个隔离窗口设置为宽范围 (m/z 696–1100) 的合理性。该设置有效避免了在低化合物密度区域划分过多窗口，从而优化了整体采集效率，将有限的扫描时间资源集中在高化合物密度区域 (m/z 500 以下)。

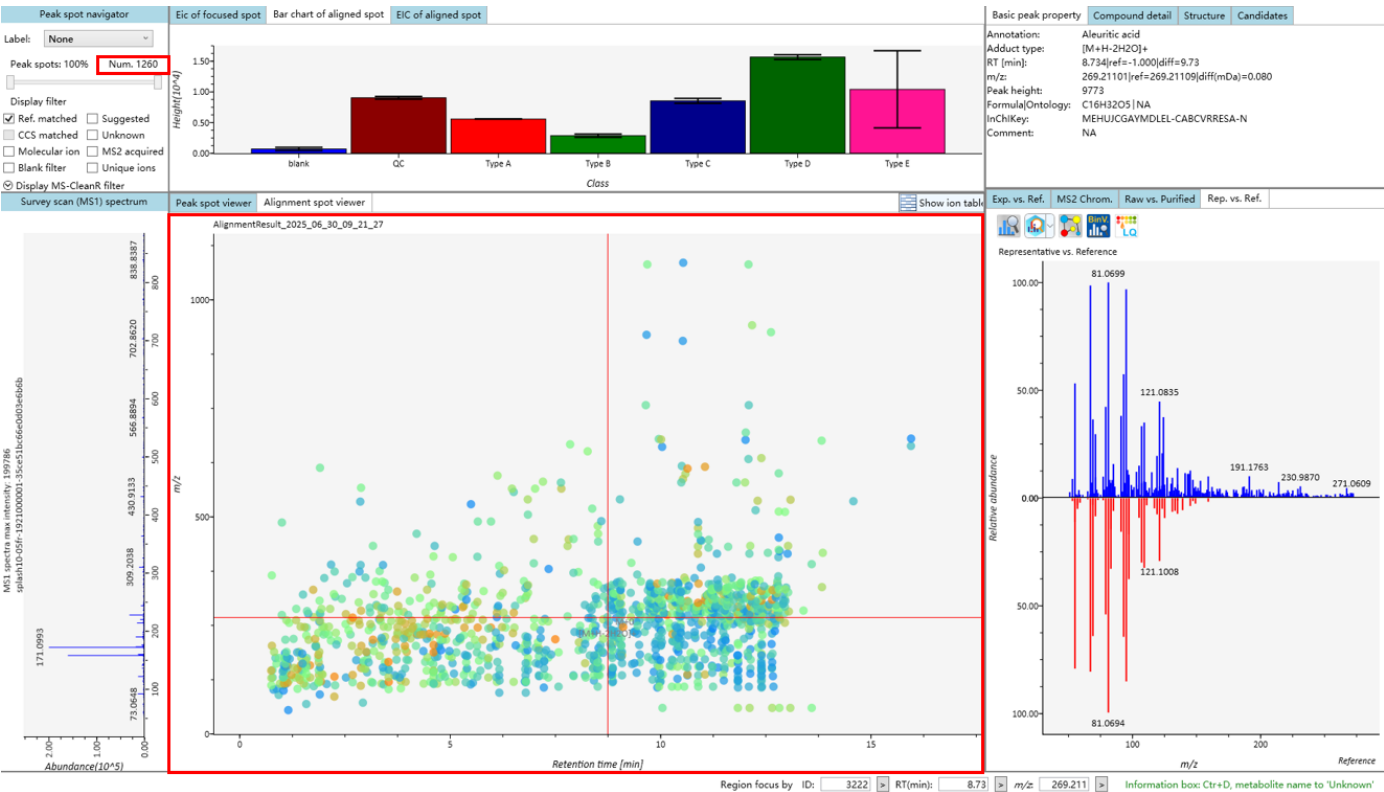


图 4. MS-DIAL 5 中展示的辣椒提取物总体分析结果

为确保 Q-RAI 数据解卷积和谱库匹配的准确性，本研究选用 auto MS/MS 采集的数据作为基准，通过典型化合物的谱图对比进行验证。以核黄素 (Riboflavin) 为例 (见图 5)，其原始 Q-RAI MS/MS 谱图 (未经解卷积) 呈现出较高的谱图纯净度，表明该化合物在宽隔离窗口内受共碎裂离子的干扰较小，为后续解卷积提供了良好基础。进一步分析其色谱行为可见，核黄素的母离子与碎片离子在色谱维度上表现出显著的共洗脱特性 (峰形一致、保留时间高度重合，见图 6)，这是解卷积算法准确归属碎片离子的关键依据。

为直接验证结果的可靠性，图 7 对比展示了 auto MS/MS (图 7a) 与 Q-RAI 解卷积后 (图 7b) 的核黄素谱图与标准谱库的匹配结果。二者在关键特征碎片离子的丰度分布和匹配度上表现出高度一致性。结果证实，对于谱图纯净度较高的化合物，Q-RAI 结合 MS-DIAL 5 解卷积流程能够生成与经典 auto MS/MS 方法同等可靠的二级谱图和鉴定结果。

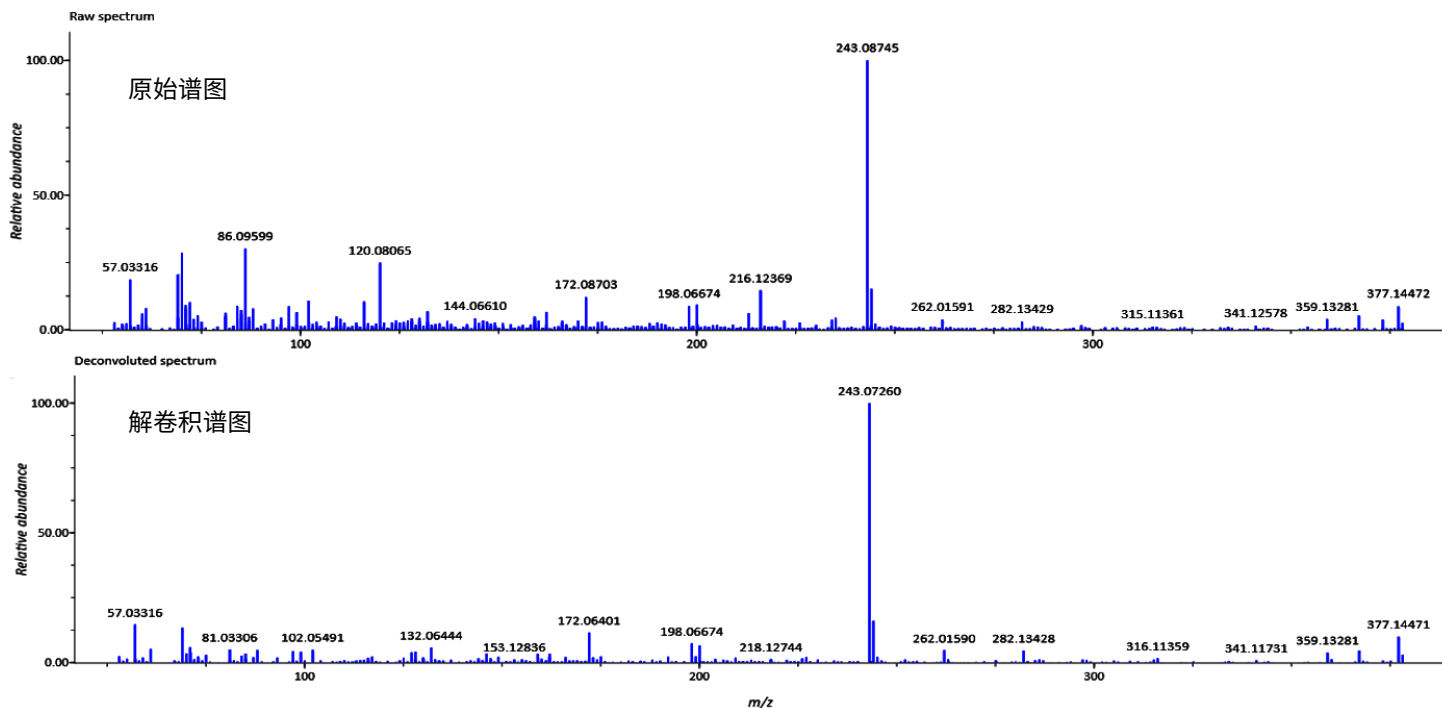


图 5. 核黄素的原始质谱图以及经过二级解卷积后的质谱图

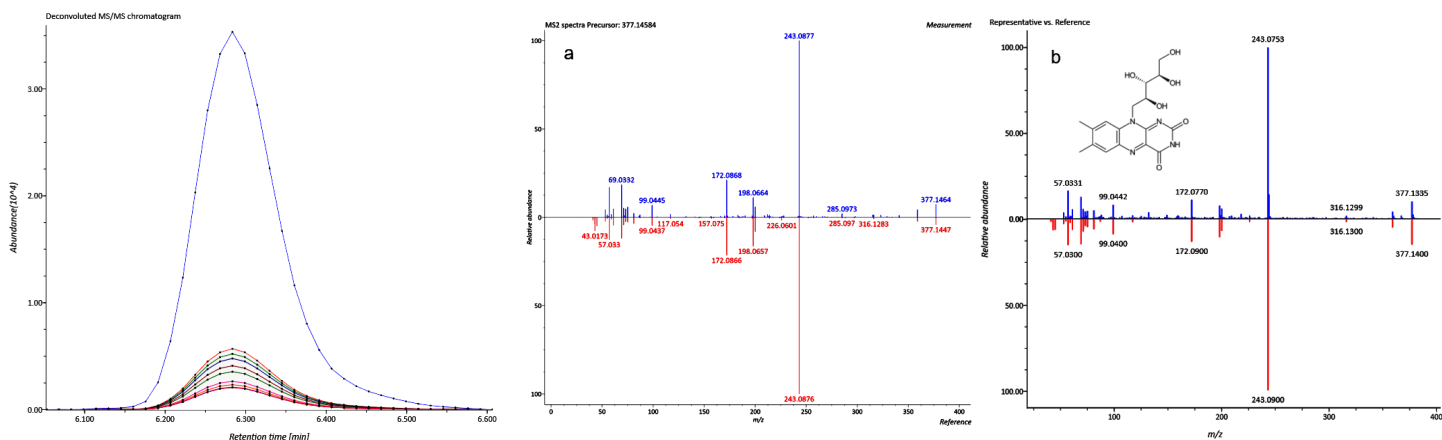


图 6. 核黄素各离子的共洗脱色谱图

图 7. 核黄素在 (a) auto MS/MS 模式和 (b) Q-RAI 模式下的谱库匹配结果

另一方面，需重点验证当原始谱图存在显著共碎裂干扰时，Q-RAI 是否能维持可靠的分析性能。选取化合物 3,5,5-三甲基-4 β -羟基-4-[3-(β -D-吡喃葡萄糖基氧基)-1-丁烯基]-2-环己烯-1-酮 (3,5,5-Trimethyl-4 β -hydroxy-4-[3-(β -D-glucopyranosyloxy)-1-butenyl]-2-cyclohexene-1-one) 作为测试案例 (见图 8)。其原始 Q-RAI MS/MS 谱图 (图 8a) 显示出明显的多离子混杂现象；经 MS-DIAL 5 二级解卷积处理后 (图 8b)，绝大多数背景噪音及非相关离子信号被有效滤除，输出谱图的洁净度显著提升。

色谱行为分析 (图 9) 进一步揭示，尽管该化合物产生丰富的碎片离子，但其母离子与所有主要碎片离子仍保持严格的色谱共洗脱特性。这一特性为解卷积算法在复杂谱图中准确提取目标信号提供了关键保障。

最终通过谱库匹配度对比验证，图 10a (auto MS/MS) 与图 10b (Q-RAI 解卷积) 在特征碎片离子的 m/z 及相对丰度上呈现出高度一致性。该结果表明，即使对于高复杂度的原始谱图，Q-RAI 结合 MS-DIAL 5 的解卷积流程仍可生成准确可靠的二级谱图。

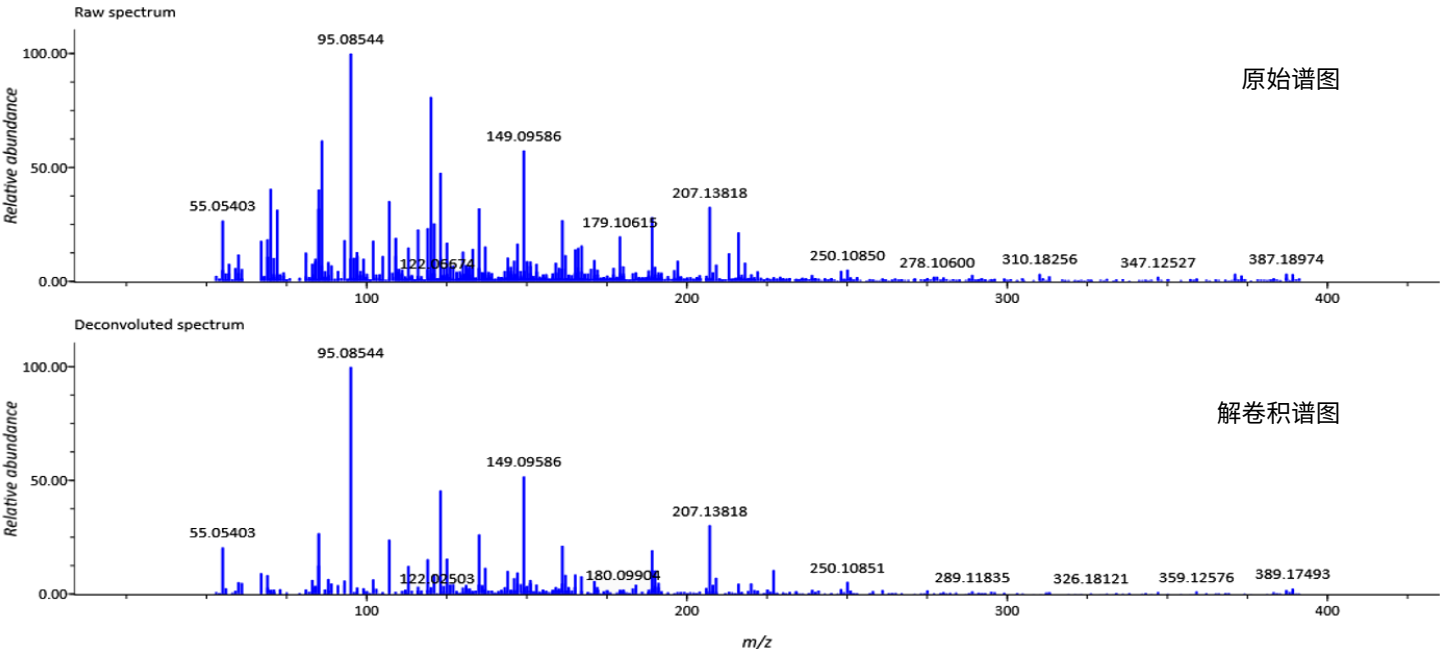


图 8. 3,5,5-三甲基-4 β -羟基-4-[3-(β -D-吡喃葡萄糖基氧基)-1-丁烯基]-2-环己烯-1-酮的原始质谱图以及经过二级解卷积后的质谱图

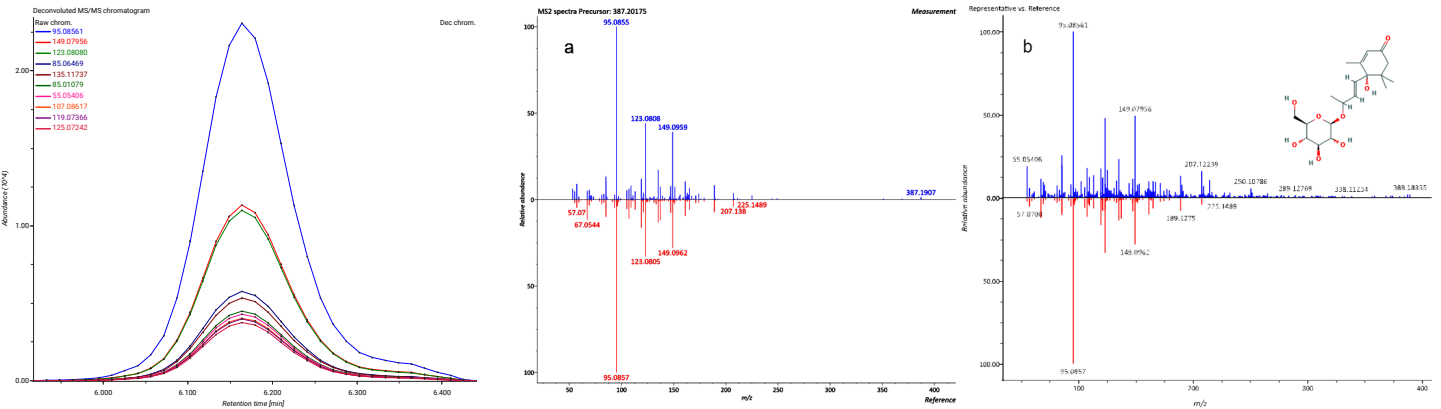


图 9. 3,5,5-三甲基-4 β -羟基-4-[3-(β -D-吡喃葡萄糖基氧基)-1-丁烯基]-2-环己烯-1-酮各离子的共洗脱色谱图

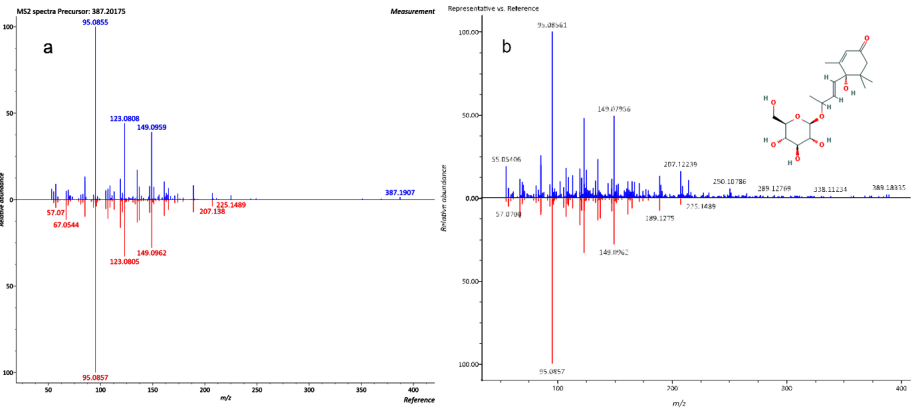


图 10. 3,5,5-三甲基-4 β -羟基-4-[3-(β -D-吡喃葡萄糖基氧基)-1-丁烯基]-2-环己烯-1-酮在 (a) auto MS/MS 模式和 (b) Q-RAI 模式下的谱库匹配结果

最终需验证的关键问题是，在高速采集条件下，低丰度碎片离子能否维持足够的信号响应以形成完整色谱峰。以二肽衍生物 L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯(L-Leucyl-L-leucine methyl ester) 为例（见图 11），其原始谱图中可见特征碎片离子 m/z 146.117，但在解卷积后的谱库匹配结果中（见图 12b），该离子未得到有效保留。根本原因可能在于， m/z 146.117 离子在色谱峰边界区域信号响应显著衰减、甚至缺失，导致其色谱峰形不完整。MS-DIAL 5 的解卷积算法将该峰识别为低质量色谱特征，进而将其滤除。

值得关注的是，尽管缺失 m/z 146.117 离子，另一高丰度特征碎片 m/z 86.0962 仍提供了充分的谱图匹配信息，其加权点积匹配相似度足以支撑正确鉴定化合物（见图 12b）。该案例同时提示，针对色谱峰边缘响应易衰减的低丰度碎片离子，可适度降低 Sigma window value 参数值（如从 0.7 调至 0.5），以放宽对色谱峰形完整性要求的阈值，从而提升此类离子的解卷积兼容性。

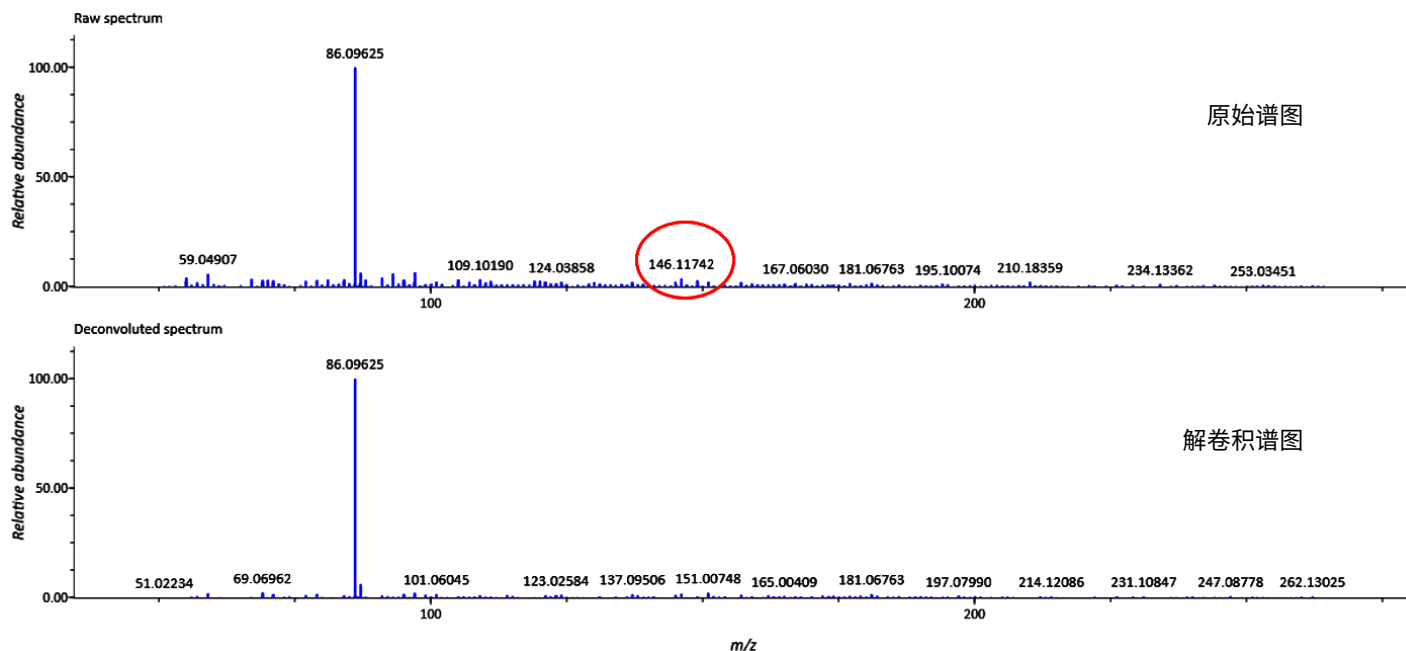


图 11. L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯的原始质谱图以及经过二级解卷积后的质谱图

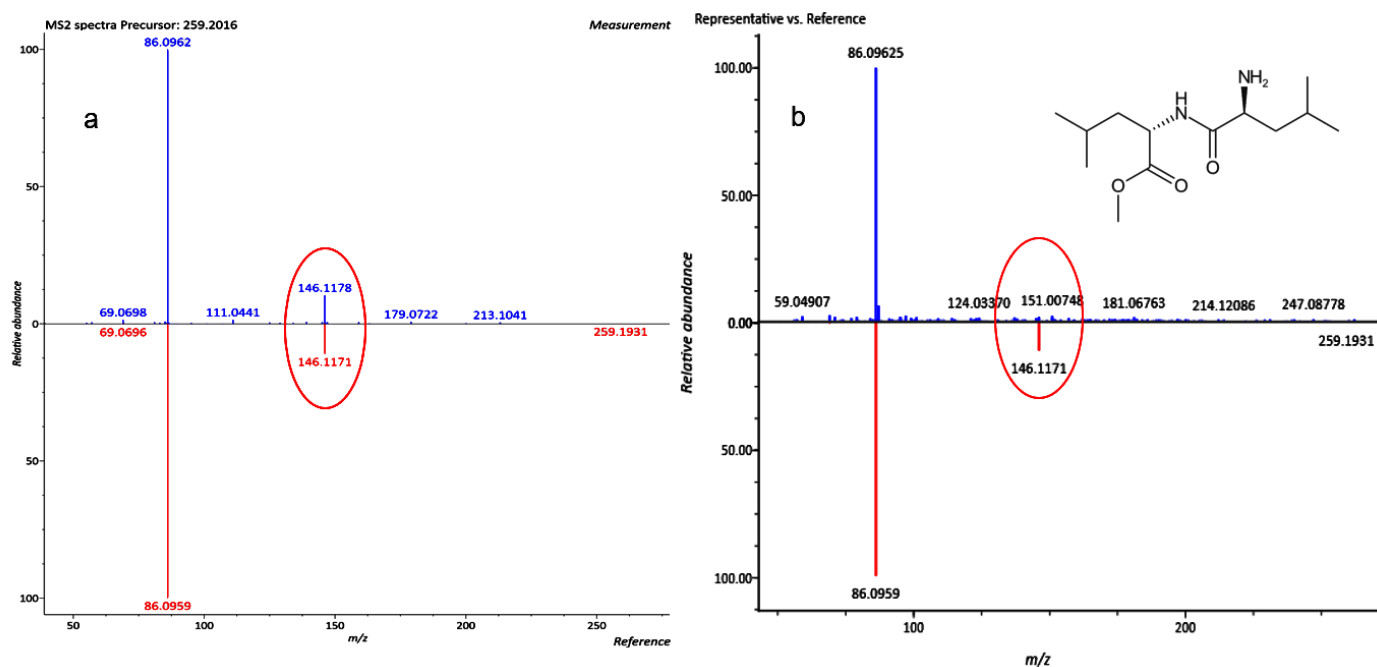


图 12. L-亮氨酰-L-亮氨酸甲酯在 auto MS/MS 模式和 Q-RAI 模式下的谱库匹配结果

结论

本研究证实，Agilent Revident Q-TOF 质谱系统的 Q-RAI 采集模式可同步获取高质量的一级和二级质谱数据。MassHunter LC/MS Data Acquisition 12 采集软件内置的方法开发辅助计算器显著简化了 Q-RAI 参数优化流程，提升了方法构建的效率。与传统的 All Ions 模式相比，Q-RAI 通过四极杆宽带隔离窗口的离子筛选机制，有效降低了二级谱图的复杂性。这一特性使 MS-DIAL 5 的二级解卷积算法能够更高效、精准地解析混合 MS/MS 谱图。与 auto MS/MS 的平行比对显示，二者在特征碎片离子匹配度和化合物鉴定结果上呈现出高度一致性。综上，Agilent Revident Q-TOF 的 Q-RAI 模式为天然产物复杂体系的高通量鉴定提供了可靠的解决方案。该方案在保证数据质量的前提下兼具操作便捷性，其方法论可进一步扩展至环境污染物筛查、代谢组学等领域。

参考文献

1. Tsugawa, H., Cajka, T., Kind, T. *et al.* MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 523–526

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

Q 安捷伦视界

www.agilent.com

DE-008513

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

本文中的信息、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，2025

2025 年 7 月 23 日，中国出版

5994-8502ZHCN