

## 小分子数据非依赖型采集筛选进展：使用高分辨率多反射飞行时间质谱

---

Michael McCullagh, Johannes P.C. Vissers, Nayan S. Mistry, Jane Cooper, Michelle Wood, Emma Marsden-Edwards, Martin Palmer

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

### 摘要

宽带无偏差数据采集（例如MS<sup>E</sup>）对于实现完整样品表征至关重要，有助于已知物和未知物的鉴定。本研究针对小分子分析进行了数据非依赖型采集(DIA)筛查。本文展示了利用混合四极杆多反射飞行时间质谱仪SELECT SERIES™ MRT进一步改善DIA的特异性。该系统创新地结合了高分辨率(>200,000 FWHM)与十亿分之一(ppb)水平的常规分析质量精度，而且不受采集速率影响。

MS<sup>E</sup>母离子和碎片离子在常规采集中即可获得ppb级的精确质量数。所达到的质量精度可助力研究人员应用更严格的检测后数据处理偏差，从而降低误检率，同时提高小分子分析物鉴定的可信度。所得数据与Waters™法医毒理学数据库中的数据进行比较，该数据库基于1900多种分析物的参比保留时间(tr)、母离子和碎片离子的精确质量数数据。应用的数据处理偏差为：t<sub>r</sub> (+/-0.35 min)、质量精度(+/-2 ppm)、特征碎片离子计数≥1、预期碎片离子偏差(+/-0.2 mDa)。

### 优势

提高非靶向筛查研究应用中小分子鉴定的可信度并降低误检率，提高分析效率。

- 增强DIA MS<sup>E</sup>性能，小分子母离子和碎片离子的质量精度可达到ppb级
-

- 应用更严格的数据处理参数，母离子偏差不超过2 ppm，碎片离子偏差不超过0.2 mDa
- 更高的质量分辨率带来了革命性的质量数测量，让我们有机会改善信息学输出，并在药物领域不断变化的环境下应对鉴定已知物和未知物的分析挑战

---

## 简介

法医毒理学实验室常常需要对复杂的生物样品实施各种筛查技术，以鉴定滥用药物、处方药和其他毒物。新型精神活性物质的不断出现，给分析带来了巨大挑战。高分辨率质谱分析（例如，飞行时间(TOF)分析）在毒理学筛查中的应用越来越广泛。宽带数据非依赖型采集(DIA)之前已应用于法医样品的非靶向筛查。高分辨率质谱分析技术(HRMS (20,000 FWHM))之前曾被用于采集不受限制且无偏差的数据集，从而提供完整的样品概况，包括母离子和碎片离子信息，可用于非靶向和靶向工作流程<sup>1-3</sup>。DIA采用MS<sup>E</sup>模式进行全扫描采集，通过在低能量与高能量之间交替，分别提供完整的母离子和碎片离子的信息。这种技术的特点可以支持对数据进行回顾性审查。所得数据与包含元素化学式、参比 $t_r$ 和高能量碎片离子信息的大型数据库进行比对，对于提供特异性和选择性鉴定结果、提高效率并降低误检率至关重要。

本研究使用SELECT SERIES MRT（图1），一种先进的混合四极杆多反射飞行时间质谱仪，来分析匿名的真实人尿液样品。本文展示了通过高质量分辨率(>200,000 FWHM)进一步增强了DIA的特异性。

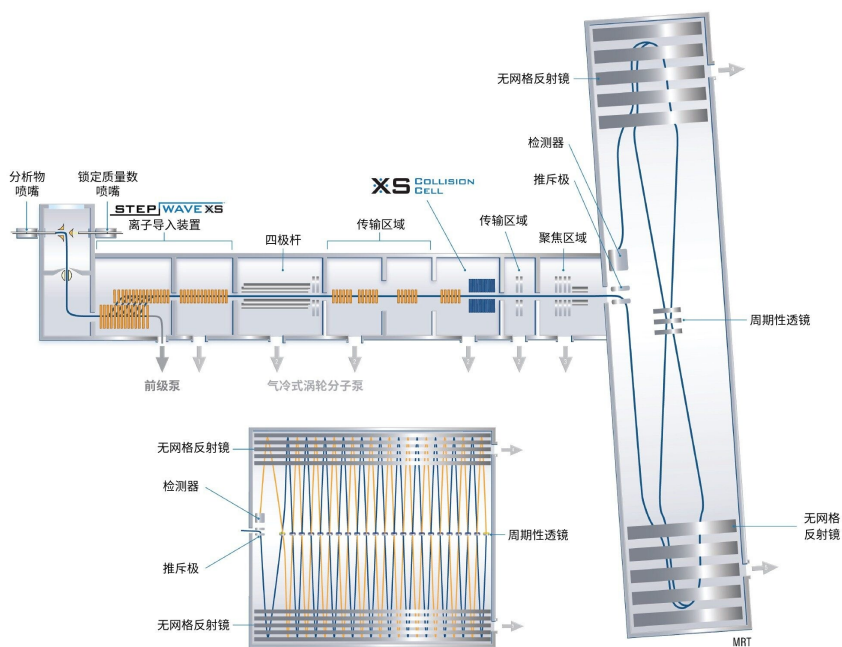


图1.SELECT SERIES MRT仪器示意图。

## 实验

### 样品描述

法医毒理学QC系统适应性测试混标（SST，10组分混合物，P/N：186007361 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186007361-forensic-tox-installation-standards-kit.html>> )

真实人尿液样品按1:10（水）的比例稀释

数据库：法医毒理学ES<sup>+</sup>（1975条目）

### 液相色谱条件

液相色谱系统： ACQUITY UPLC™ I-Class  
Premier色谱系统

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱

柱温: 50 °C

样品温度: 6 °C

进样体积: 5 μL

流速: 0.4 mL/min

流动相A: 5 mM甲酸铵缓冲水溶液, 用甲酸调节至pH 3

流动相B: 含0.1% v/v甲酸的乙腈溶液

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	87	13	初始
0.5	0.4	87	13	6
10.0	0.4	50	50	6
10.75	0.4	5	95	6
12.25	0.4	5	95	6
12.5	0.4	87	13	6
15.0	0.4	87	13	6

## MS条件

采集: ES<sup>+</sup>

毛细管电压:	0.8 kV
脱溶剂气温度:	500 °C
离子源温度:	120 °C
锥孔电压:	20V
碰撞能量范围:	15–40 eV
质量范围:	<i>m/z</i> 50-2400
MS <sup>E</sup> 采集速率:	10 Hz
数据分析和可视化:	MassLynx™ v4.2 SCN1026和waters_connect 3.1.0.243, Tibco Spotfire® 6.0.0软件 (加利福尼亚州帕洛阿托)

---

## 结果与讨论

研究对一系列匿名的真实人尿液样品进行了数据分析。将数据与Waters法医毒理学数据库进行了比对，该数据库基于1975种毒理学相关分析物（包括违禁药物、农药、处方药和非处方药(OTC)）的tr、母离子和碎片离子的精确质量数数据。

在筛查真实的人尿液样品之前，使用SST混标对系统性能进行了评估。数据处理时采用保留时间偏差( $t_r$ )  $\pm$  0.35 min，母离子质量精度偏差  $\pm$  2 ppm，并要求至少有1种特征碎片离子，质量数偏差0.2 mDa。对于SST混标（250 pg/ $\mu$ L），获得了522 ppb的质量精度RMS误差，而对于稀释系列（2.5~500 pg/ $\mu$ L），SST混标组分的质量精度RMS误差请参见图2。

与数据库比对后，成功鉴定出所有SST混合分析物，这确证了严格的质量精度数据处理参数的可行性，为母离子和碎片离子鉴定提供了更高的特异性，从而有助于减少误检。

对于复杂分析，MRT可实现的质量分辨率支持区分基质干扰物和目标分析物，并通常可以达到ppb级的质量精度。图3展示了氯氮平MS<sup>E</sup>碎片离子谱图的常规ppb级质量精度性能示例，其中m/z 84.08078碎片离子的质量分辨率为130000 FWHM。

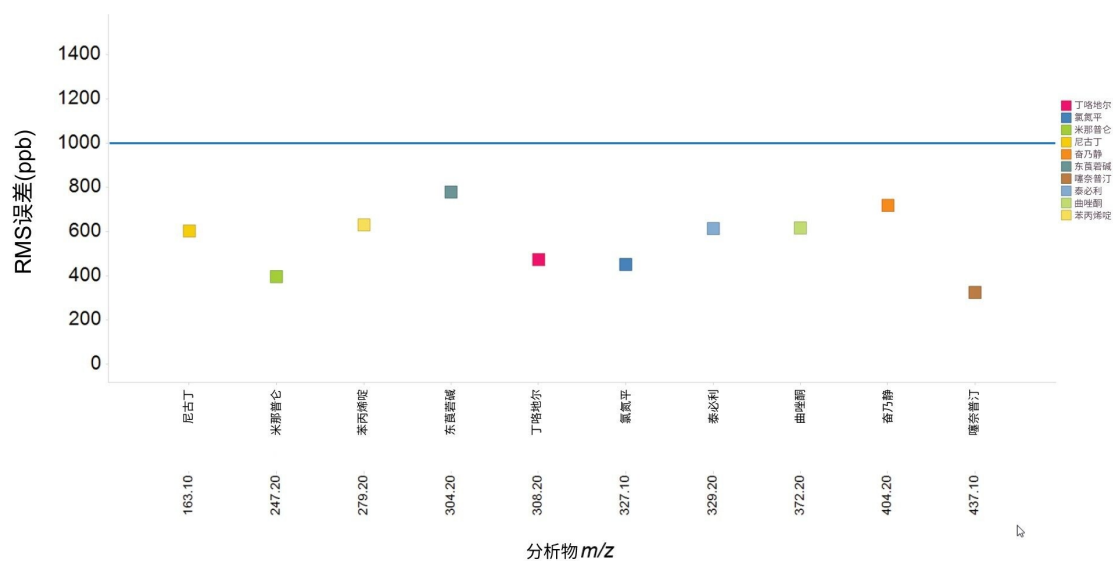


图2. LC-MRT-MS<sup>E</sup> ES<sup>+</sup>下SST混标母离子质量精度ppb (RMS)

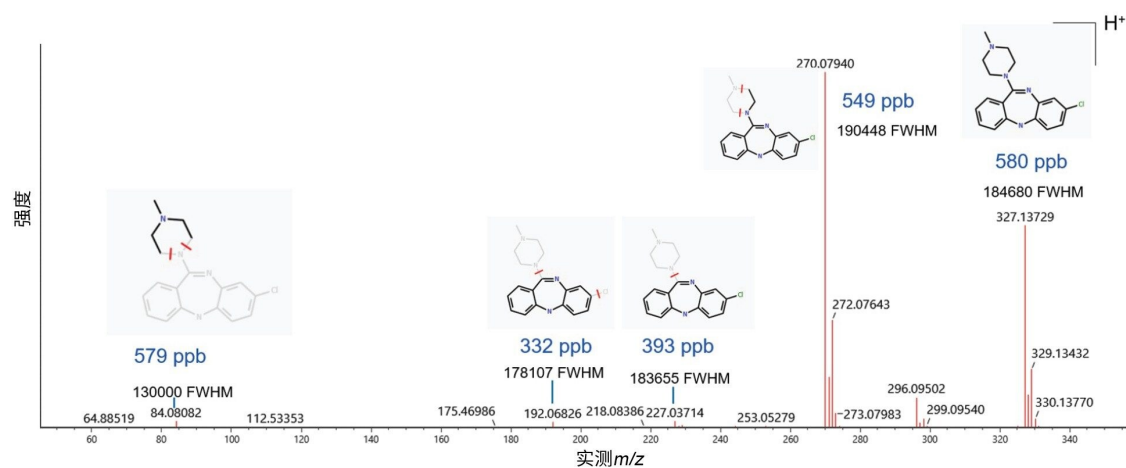


图3.SST混标组分氯氮平([M+H]<sup>+</sup> m/z 327.13710)的LC-MRT-MS<sup>E</sup> ES<sup>+</sup> 碎片离子谱图。

在处理真实尿液样品时，也应用了相同严格的偏差标准，并与毒理学数据库中的结果进行了对比。鉴定包括违禁药物和处方药及其代谢物，以及饮食和内源性成分。例如，在样品“103”中，羟考酮已作为误检结果被排除。甲基苯丙胺被鉴定出，其质量数测量误差为87 ppb，而美沙酮则为-83 ppb（参见图4）。此外，研究中还鉴定了药物代谢物以及由饮食产生的化合物，这些化合物的整体质量数测量误差为511 ppb (RMS)，提供了鉴定结果真实的可信度。

与软件工具相结合，常规ppb级质量精度可以提供更高的可信度和一种高时间效率的策略，来确定因使用娱乐性药物而产生的阳性鉴定结果。在样品“51”中，重复分析已确认鉴定出多药滥用，包括违禁药物、处方药和OTC药。鉴定出的小分子药物组合如图5所示。如此之多的药物鉴定类别凸显了分析上的挑战，同时也说明了需要无偏差DIA的原因。除尼古丁、咖啡因及相应的代谢物之外，研究中还鉴定出14种“药物”化合物、7种药物代谢物和内源性尿液基质。

1)

组分汇总		RMS误差 = 511 ppb									
组分名	标签	鉴定状态	实测m/z	质量误差(mDa)	质量数误差(ppm)	实测RT(min)	预期保留时间(min)	预期检出碎片离子	预期碎片离子计数	响应	加合物
1		已鉴定	195.0877	0.074	0.382	2.23	2.08		1	3	56509 +H
2		已鉴定	320.1889	0.111	0.346	2.03	1.85		3	103397 +H	
3		已鉴定	300.1598	0.385	1.284	1.87	1.70		2	52950 +H, +K, +Na	
4		已鉴定	286.1441	0.289	1.012	1.73	1.60		1	4882 +H	
5		已鉴定	177.1023	0.043	0.240	1.12	1.07		4	12723 +H	
6		已鉴定	278.1904	0.058	0.207	7.55	7.29		3	128601 +H	
7		已鉴定	310.2165	-0.026	-0.083	8.69	8.44		4	96017 +H	
8		已鉴定	150.1277	0.013	0.087	2.70	2.47		2	10663 +H	
9		已鉴定	119.0856	0.032	0.270	2.70	2.47		1	1311 +H	
10		已鉴定	286.1439	0.104	0.363	1.12	1.10		3	16227 +H, +Na	
11		已鉴定	272.1282	0.111	0.407	1.11	1.01		4	1301 +H	
12		已鉴定	462.1759	0.054	0.116	0.95	1.00		1	127697 +H, +K, +Na	
13		已鉴定	163.1228	-0.162	-0.995	0.76	1.03		4	8928 +H	
14		已鉴定	181.0722	0.159	0.876	1.26	1.20		3	27517 +H	
15		已鉴定	181.0721	0.052	0.289	1.53	1.46		1	84217 +H	

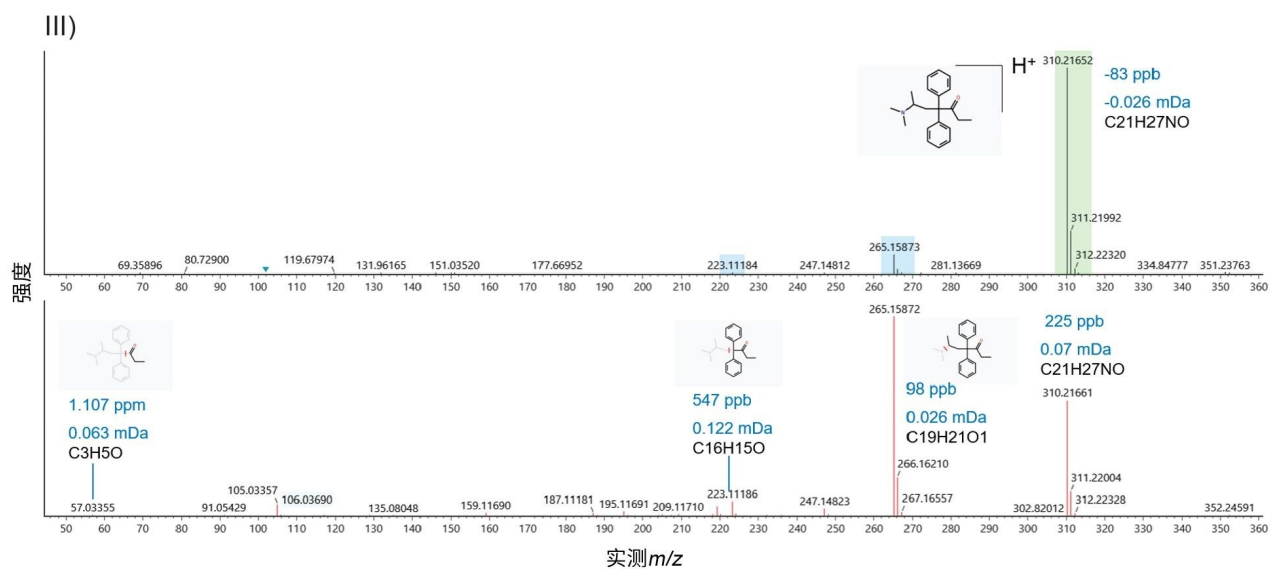
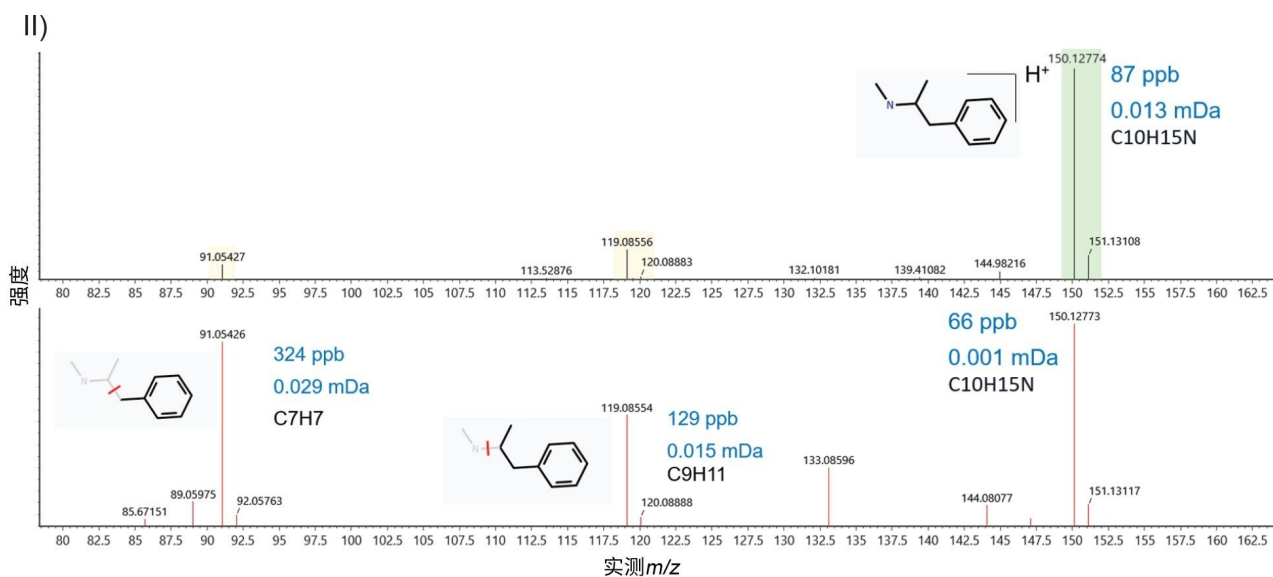
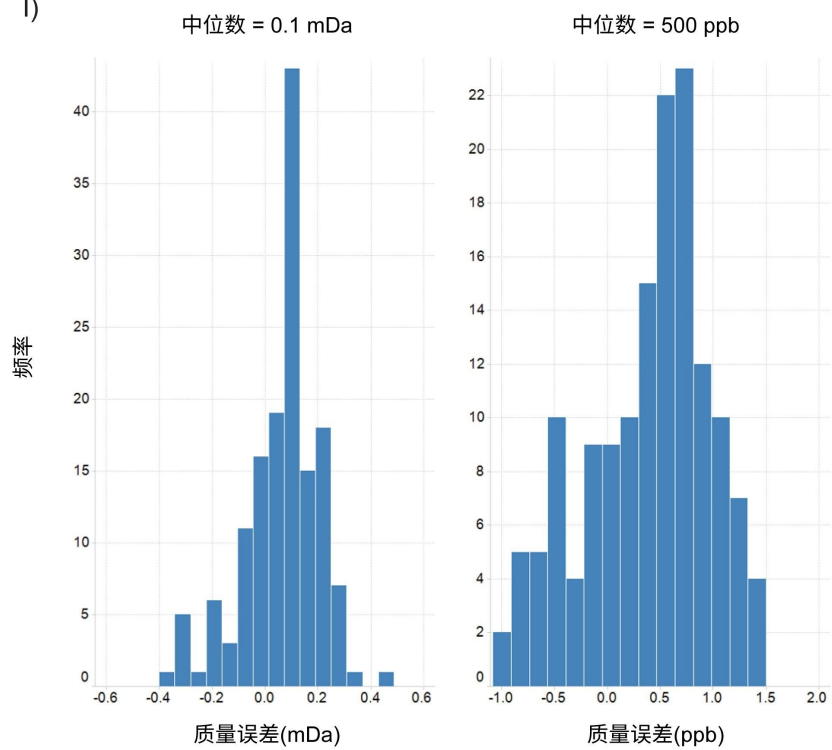


图4.1) 组分汇总，展示了在匿名人尿液样品“103”中鉴定出的违禁药物、处方药、OTC药和膳食化合物。II) 甲基苯丙胺的母离子和碎片离子 $MS^E$ 增强谱图。III) 美沙酮的母离子和碎片离子 $MS^E$ 增强谱图。



l)



II)

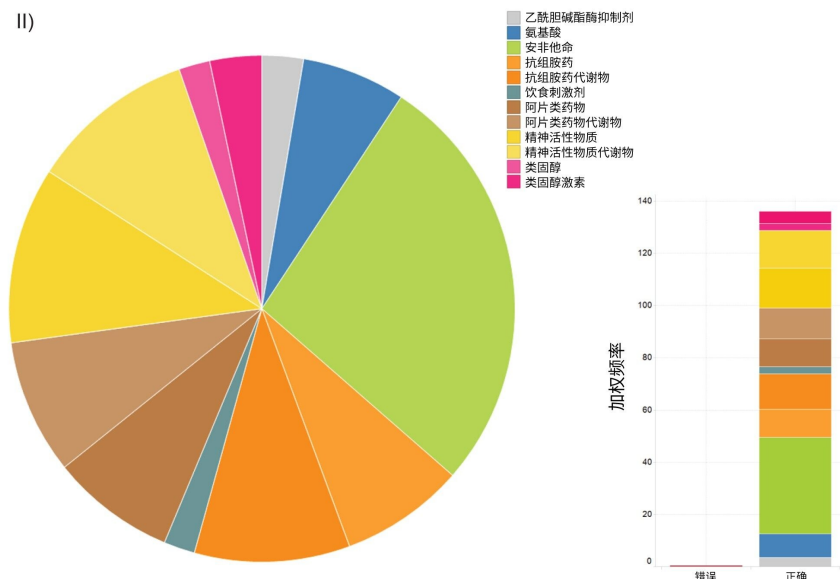


图5.1)“样品51”中确定存在的分析物鉴定的质量数测量误差频率分布。II)“药物类别”的分布以及实测到的正确/错误检出结果的加权频率图。

我们在研究过程中开展了特定的考察，评估了安非他命( $m/z$  136.11207)、甲基苯丙胺( $m/z$  150.12773)、伪麻黄碱( $m/z$  166.12264)和MDA ( $m/z$  180.10191)，这些化合物可能因来自质谱仪的离子源/传输离子光学元件传递的能量而容易发生不稳定碎裂。图4展示了甲基苯丙胺的碎裂程度最低。然而，在LCMS分析条件下，尽管安非他命母离子 $m/z$  136.11207在低能量谱图中形成了基峰离子，但仍观察到它的不稳定碎裂（图6）。使用直接注样分析，可优化仪器参数，减少不稳定碎裂。在低温条件下(100 °C)，对于安非他命，较低的离子源温度可大幅减少不稳定碎裂（图6插图）。

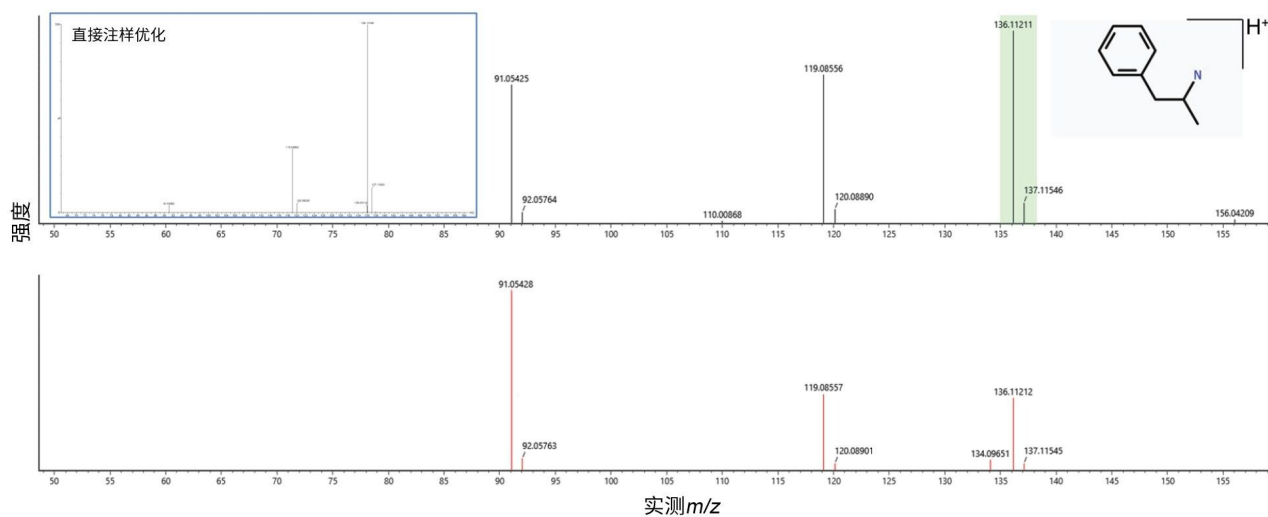


图6.安非他命在LCMS<sup>E</sup> ES<sup>+</sup>下母离子和碎片离子增强谱图，以及低温直接注样分析结果（插图）。

## 结论

高质量分辨率可增强离子选择性，进而改善复杂基质中分析物的检测。SELECT SERIES MRT仪器常规分析的ppb级质量精度性能可生成高质量的质谱数据，有助于使用非靶向筛查工作流程明确确定分析物的元素组成。在不断变化的药物领域中，质量精度特异性的增加能够在涉及小分子药物的研究中提高鉴定的可信度。软件工具是充分利用数据集中所有可用信息的关键要素，数据质量与信息学功能之间存在着共生关系。可靠地应用严格的数据处理偏差，可以提高分析效率。本研究使用保留时间、母离子和碎片离子以ppb级的质量精度成功鉴定除了所有样品中的违禁药物。所有样品中对于其他娱乐性药物或OTC药物也呈阳性结果。

## 参考资料

1. Rosano TG, Wood M, Ihenetu K, Swift TA. Drug Screening in Medical Examiner Casework by High-Resolution Mass Spectrometry (UPLC-MS<sup>E</sup>-TOF). *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 37, Issue 8, October 2013, Pages 580-593.

2. Twohig M, Aubin AJ, Hudalla CJ.使用非靶向筛查和高分辨率质谱法表征 $\Delta^8$ -THC馏出物.沃特世公司应用纪要.库编号.720007720ZH.2022年10月.
3. Bonn B, Leandersson C, Fontaine F, Zamora I. Enhanced metabolite identification with MS(E) and a semi-automated software for structural elucidation.*Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010 Nov 15;24(21):3127-38.

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

SELECT SERIES MRT <[https://www.waters.com/waters/en\\_US/SELECT-SERIES-MRT/nav.htm?cid=135082877](https://www.waters.com/waters/en_US/SELECT-SERIES-MRT/nav.htm?cid=135082877)>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

waters\_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720008047ZH, 2023年10月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)