

应用纪要

## 利用HRMS对菠菜样品进行农药定性筛查和二元比较

---

Gareth E. Cleland, Kendon S. Graham, Kenneth J. Rosnack, Adam Ladak, Jennifer A. Burgess

Waters Corporation



---

## 摘要

多分析物筛查方法是全球范围内监测食品和环境样品的重要手段，这些方法的目标是剔除合规样品，并鉴定不合规样品以供后续确认和定量。因此，方法的灵敏度必须符合相关法规对复杂基质中残留物的限值要求。此外，还必须按照相关法规要求对方法进行验证。理想情况下，在样品前处理到结果报告的整个过程中，该方法应快速、经济有效且流程精简。

许多实验室开始逐步改用高分辨率质谱(HRMS)筛查技术，理论上而言，该技术能够在监测任意数量目标物质的同时提供有助于发现未知化合物或目标代谢物的信息。

本案例研究通过分析真实样品，将非靶向数据非依赖型分析 ( $MS^E$ 和 $HDMS^E$ ) 与先进的科学信息系统(UNIFI)联用，对食品和环境样品进行多分析物筛查，展示了此方法的易用性和有效性。本应用纪要介绍了一种新颖的数据审查方式，用户可以在常规环境中使用科学软件自行定义。

## 优势

- 理论上，通过单次进样即可筛查任意数量的化合物。
- 可同时收集靶向或非靶向分析的无偏差定性和定量数据。
- 借助筛选、二元比较和统计分析功能解析数据，找出感兴趣的未知化合物。
- 分离出感兴趣的未知化合物时，可进行结构表征。
- 可使用母离子和碎片离子的精确质量数信息执行历史数据审查。

## 目的

准确、轻松地审查HRMS数据，确定与空白菠菜样品相比，菠菜样品中是否存在感兴趣的目标质量数和未知质量数化合物。

---

## 简介

多分析物筛查方法是全球范围内监测食品和环境样品的重要手段，这些方法的目标是剔除合规样品，并鉴定不合规样品以供后续确认和定量。因此，方法的灵敏度必须符合相关法规对复杂基质中残留物的限值要求。此外，还必须按照相关法规要求对方法进行验证。理想情况下，在样品前处理到结果报告的整个过程中，该方法应快速、

经济有效且流程精简。

迄今为止，LC-MS/MS或GC-MS/MS串联四极杆技术就能满足上述要求，并且也是目前执行这些分析时实际使用的技术。但是，随着加到监测和观察列表中的分析物越来越多，典型筛查方法的范围也在不断扩展。此外，筛查目标列表以外的化合物也变成越来越普遍的需求。因此，许多实验室开始逐步改用高分辨率质谱(HRMS)筛查技术，理论上而言，该技术能够在监测任意数量目标物质的同时提供有助于发现未知化合物或目标代谢物的信息。

本案例研究通过分析真实样品，将非靶向数据非依赖型分析 ( $MS^E$ 和 $HDMS^E$ )<sup>1</sup>与先进的科学信息系统(UNIFI)联用，对食品和环境样品进行多分析物筛查，展示了此方法的易用性和有效性。本应用纪要重点介绍一种新颖的数据审查方式，用户可以在常规环境中使用科学信息系统自行定义。本文详细介绍如何建立一种简洁、快速、简便且一致的方法来审查HRMS数据，只要一个处理步骤就有可能回答图1中所列的四个问题。

---

## 实验

### 样品分析和数据处理

样品瓶由合作伙伴提供，内含菠菜提取物和加标菠菜提取物的100%乙腈(ACN)溶液，基质中浓度为1.0 g/mL，使用QuEChERS制备。用水按1:1的比例稀释样品，使基质中浓度为0.5 g/mL。进样5  $\mu$ L。使用UNIFI收集并处理非靶向数据非依赖型分析( $MS^E$ )<sup>1</sup>的数据。之前的一篇应用纪要<sup>2</sup>详细介绍了收集非靶向数据集时所使用的参数，并强调了数据组分化<sup>3</sup>的重要性，因为该方法能够轻松、一致且快速地解析生成的复杂数据集。

通过与529种农业残留物的目标列表进行对比，解析组分化数据，确定是否存在感兴趣的未知质量数化合物。使用批量解析工具解析感兴趣的非目标质量数。本分析重点考察了Waters™农药筛查应用解决方案的精确质量数定性筛查、二元比较和未知物筛查功能，在图1所示的四个问题中，有三个问题得到解决（突出显示）。

合作伙伴十分肯定，加标菠菜样品含有目标列表中没有的农药残留，他们希望了解这些非目标残留是如何被发现和解析的。关于这一工作原理的详细说明，请参阅本应用纪要末尾的“工作流程步骤要点”部分。

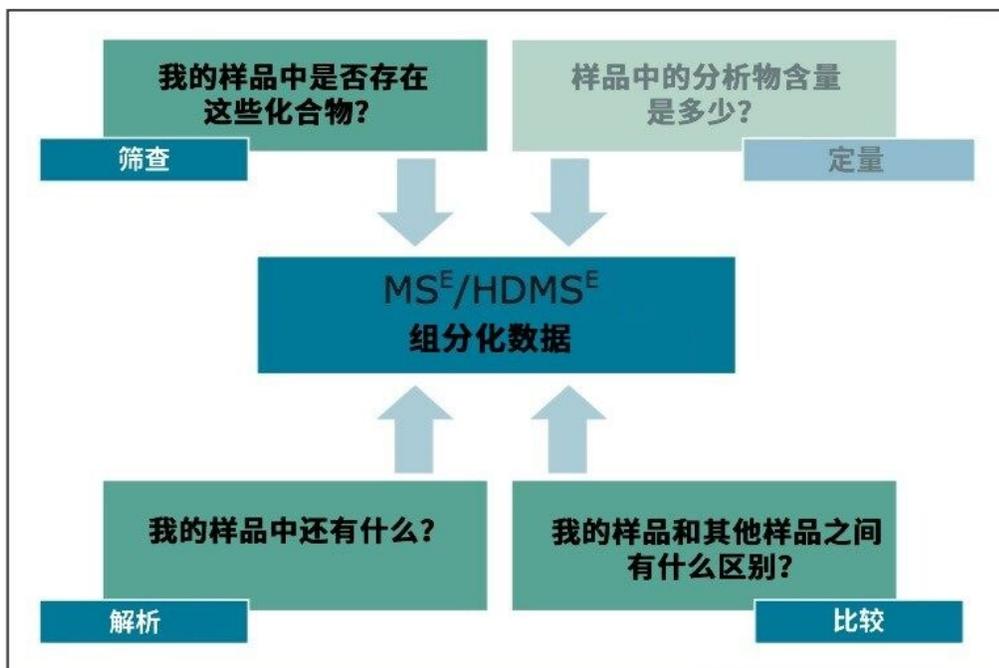


图1.现代多残留筛查方法的基本问题。

这些案例研究旨在展示用户应如何利用UNIFI中的工作流程、视图和筛选器，以快速、高效、系统化且可重现的方式，完成从进样到出具准确报告的各项工。此定性分析使用的工作流程如图2所示。工作流程（左）由一系列步骤组成，用户可以通过这些步骤简明、一致地审查HRMS数据，每个步骤都包含自定义筛选器和视图。

用户可以利用显示的信息针对图1中列出的问题快速做出决策。

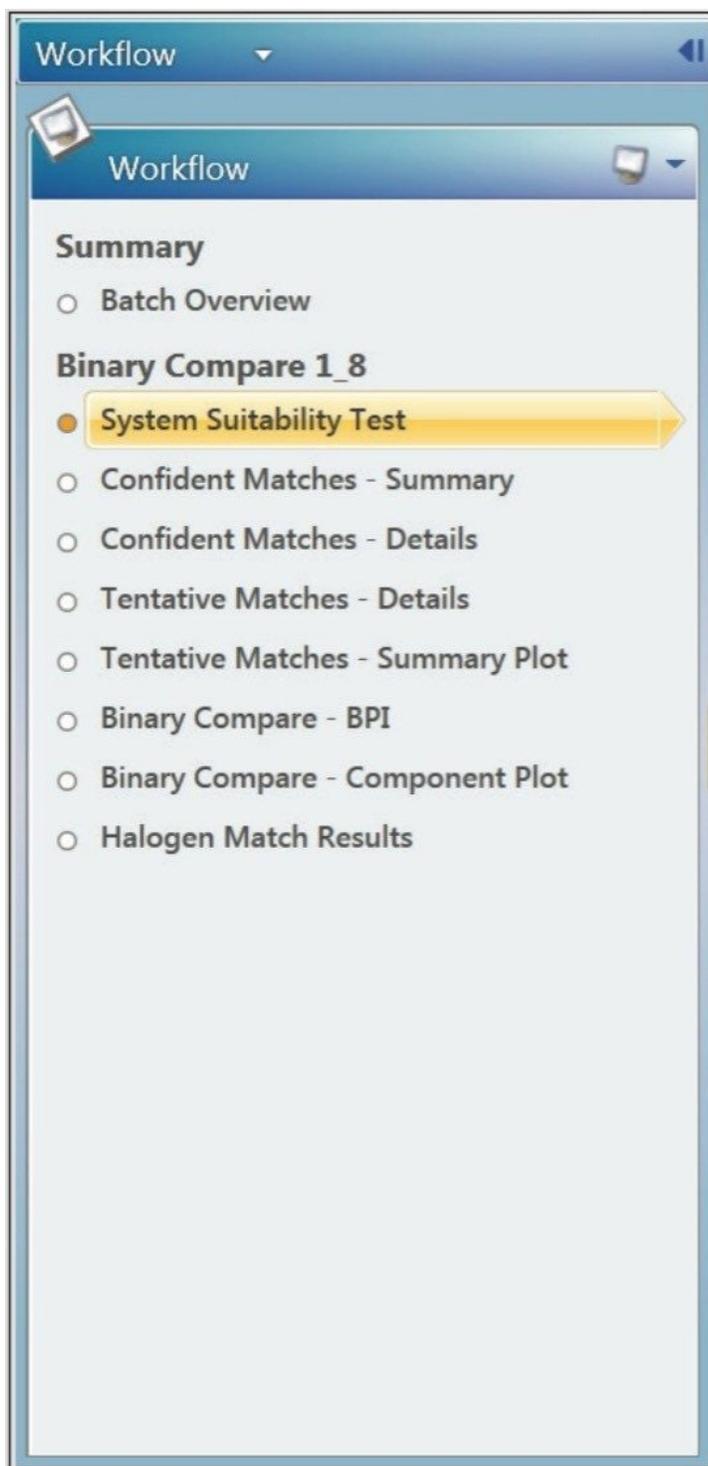


图2.审查加标菠菜样品数据所用的UNIFI数据审查工作流程。

---

## 结果与讨论

表1列出了合作伙伴提供的菠菜样品中加标的化合物。我们通过数据审查报告了合作伙伴添加到菠菜样品中的所有化合物，其中有9种化合物来自529种化合物的目标列表。通过与空白菠菜样品进行二元比较，或使用UNIFI中的卤素匹配工具，发现有五种感兴趣的化合物不存在于目标列表中。利用UNIFI中的发现工具解析这五个感兴趣的质量数，该工具本质上是一种批量解析工具。

加标菠菜样品 (0.5 g/mL)		沃特世结果
加标/供试品	是否存在于目标列表中	
阿特拉津	是	已报告
氯虫苯甲酰胺	是	已报告
呋虫胺	是	已报告
甲氰菊酯	是	已报告
氟啶虫酰胺	是	已报告
氟氟虫脞	是	已报告
甲胺磷	是	已报告
多氟脲	是	已报告
对硫磷	是	已报告
啉啉菌胺	否	已报告
联苯吡菌胺	否	已报告
氟啉菌苯胺	否	已报告
吡奥芬酮	否	已报告
霜霉灭	否	已报告

表1.利用沃特世PSAS进行农药筛查时，合作伙伴加标的化合物列表与匹配的化合物比较。

---

## 结论

灵敏度 - MS<sup>E</sup>提供了无偏差的非靶向数据集，灵敏度足以检测农药中浓度低于MRL的母离子和子离子。

速度 – 扫描速率根据所开发的UPLC方法的峰宽设置，用于收集全面的MS<sup>F</sup>数据。快速的占空比使用户能够在单次进样中为母离子通道和子离子通道捕获足够的色谱峰数据点，以便尽可能改善鉴定标准和定量结果。

选择性 – Apex 3D峰选择和组分化可提高特异性，使用户能够解析复杂样品中感兴趣的目标、非目标和未知质量数数据，无需对原始数据进行额外处理。

有效性 – 通过利用筛选器、工作流程和视图，用户可以在常规环境中一致、简洁且全面地审查大型数据集，在进样后快速获得准确的结果。

---

## 参考资料

1. An Overview of the Principles of MS,E The Engine that Drives MS Performance.Waters white paper no.720004036en.October, 2011.
2. G Cleland, K Graham, K Rosnack, J Burgess.Simple HRMS Data Review Using Workflows, Views, and Filters Within a Novel Integrated Scientific Information System.Waters technical note no.720005436en, July, 2015.
3. G Cleland, K Graham, K Rosnack, J Burgess.Qualitative Pesticide Screening of a Dried Cherry Sample using HRMS.Waters application note no.720005437en.July, 2015.
4. ChemSpider数据库<http://www.chemspider.com> 英国皇家化学学会.[2015年7月引用].

## 附录

### 附录：工作流程步骤要点

工作流程步骤6–8：利用二元比较和卤素匹配特征进行非靶向（未知物）筛查

数据的组分化可确保所有感兴趣的候选质量数都包含在同一个数据集中，以便根据目标列表进行解析，或确定是否存在感兴趣的未知质量数化合物。搜索未知物不需要额外的处理。所有特征（候选质量数）均通过组分化提取。

UNIFI提供了多种可以比较参比样品与未知样品的方法。利用基峰强度(BPI)二元比较功能可以轻松显示较大差异（图3）。



Component Summary						
	Unknown component name	Reference component name	Match type	Unknown intensity (Counts) <sup>1</sup>	Reference intensity (Counts)	Unknown/Reference
1	Candidate Mass 366.1108		Unknown Unique	1658909	0	
2	Candidate Mass 537.3047	Candidate Mass 537.3035	Common	1458163	1711931	0.8518
3	Candidate Mass 637.3070	Candidate Mass 637.3066	Common	1318903	1416716	0.9310
4	Candidate Mass 776.2325	Candidate Mass 776.2335	Common	880585	62819	14.0179
5	Candidate Mass 599.4100	Candidate Mass 599.4106	Common	854975	409778	2.0864
6	Candidate Mass 276.2186		Unknown Unique	802916	0	
7	Candidate Mass 282.2787	Candidate Mass 282.2792	Common	723812	449929	1.6087
8	Candidate Mass 599.4100	Candidate Mass 599.4107	Common	667805	2001694	0.3336
9	Candidate Mass 256.2634	Candidate Mass 256.2634	Common	647586	108319	5.9785
10	Candidate Mass 599.4096	Candidate Mass 599.4104	Common	611471	743568	0.8223
11	Candidate Mass 599.4099	Candidate Mass 599.4102	Common	597927	812473	0.7359
12	Candidate Mass 702.2134	Candidate Mass 702.2138	Common	538117	100217	5.3695
13	Candidate Mass 537.3041	Candidate Mass 537.3033	Common	523931	636507	0.8231
14	Candidate Mass 318.1979		Unknown Unique	521260	0	
15	Candidate Mass 599.4101	Candidate Mass 599.4100	Common	513382	673630	0.7621

图4.二元比较 - 组分概要：比较菠菜空白样品（参比样品）和菠菜加标样品（未知样品）得到的组分化数据的表格视图。用户可以查看参比样品和未知样品中所有检出组分的响应和响应比率。还可以应用筛选器来仅显示“未知样品独有”、“参比样品独有”或“共有”组分。

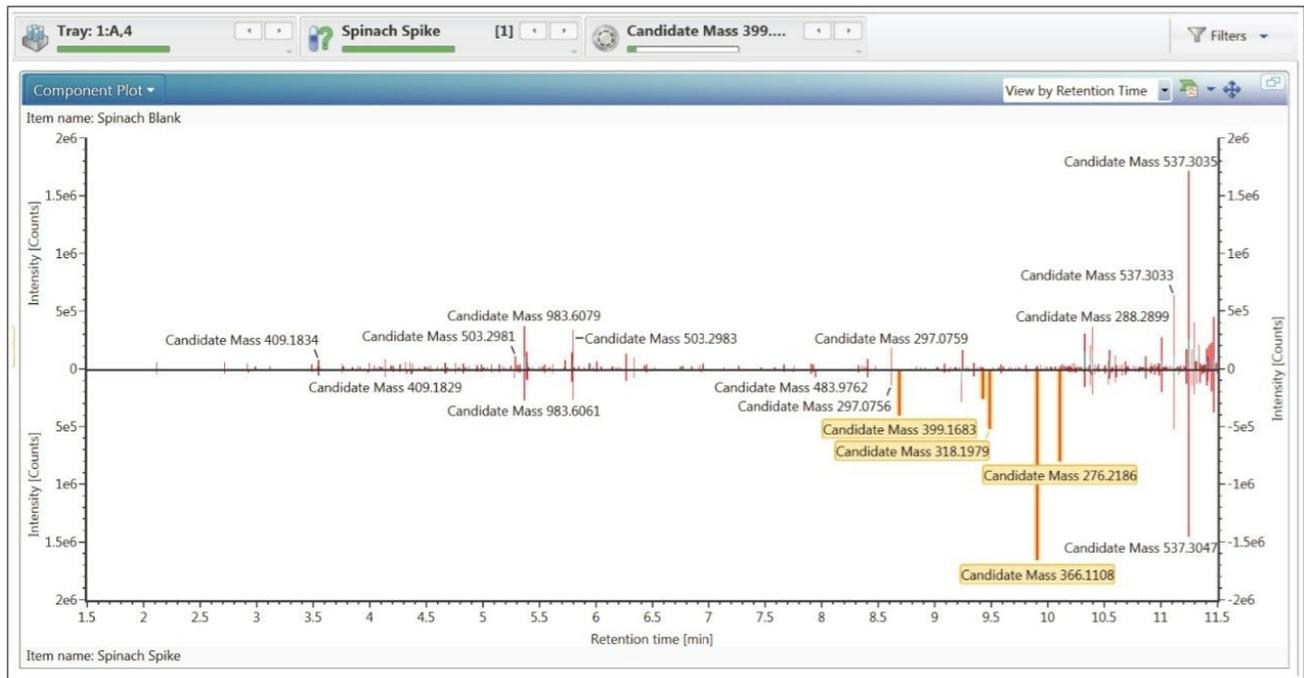


图5.二元比较 – 组分图：即时识别感兴趣的质量数，用户可以选中这些质量数并直接发送到解析工具包。

利用卤素匹配功能也可以发现感兴趣的未知质量数（图6）。在单个处理阶段，利用质量数差异和同位素强度评估每个未鉴定的质量数中是否存在氯原子和溴原子。此工作流程步骤利用简单的筛选器在定义的质量范围内突出显示可能含有卤素并且高于强度阈值的质量数。选择显示的信息是组分概要、提取离子流色谱图和质谱图（图6）。组分概要中突出显示了保留时间、响应值以及推测的氯和溴离子数量等信息。用户可以使用谱图窗口快速评估每种可能含有卤素的化合物。色谱图窗口显示了选定候选质量数的提取离子流色谱图(XIC)。图6中突出显示了三个质量数，这表示在二元比较结果（图5）中突出显示的五个质量数中，有三个质量数同样满足卤素匹配工具的标准。UNIFI中还有其他工具（本文未展示）能够发现感兴趣的未知质量数，例如共有碎片离子、质量数亏损和中性丢失。此外还提供全面的多变量分析功能（本文未展示）用于完整的未知物筛查实验。

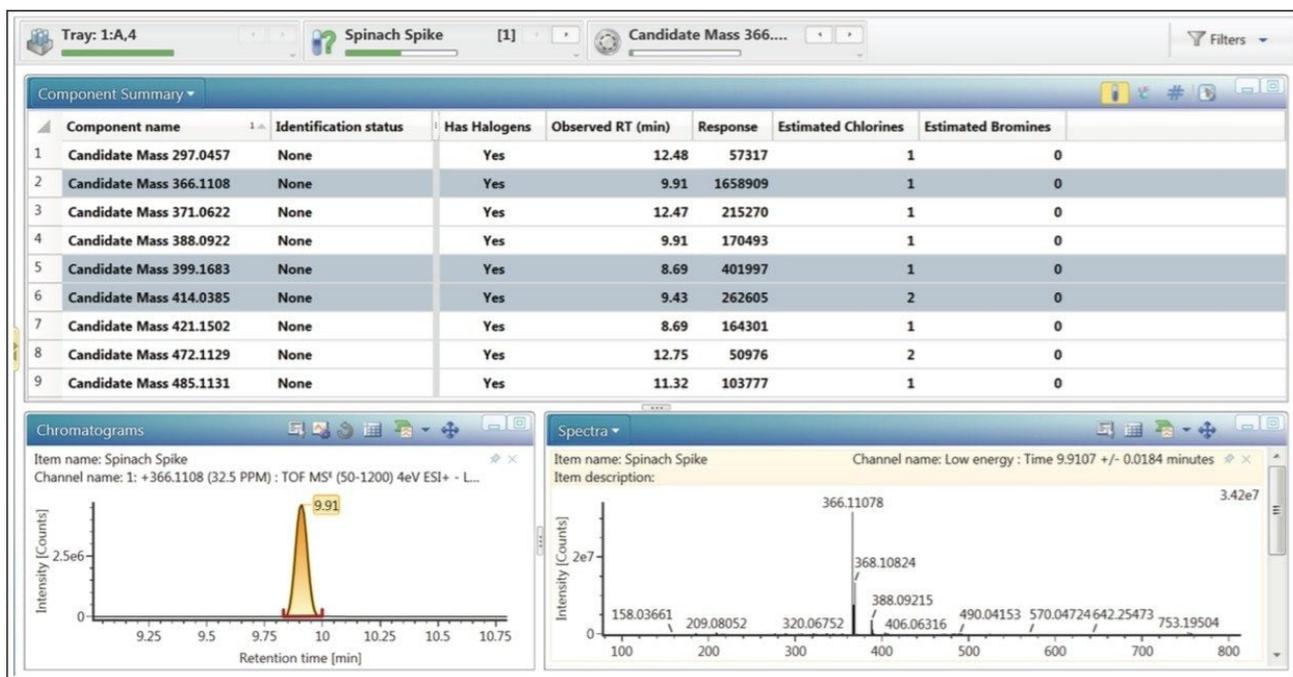


图6.此工作流程步骤无需重新处理，即可显示所选进样中感兴趣的可能含有卤素的化合物。还显示了母离子和子离子谱图以及母离子的提取离子流色谱图。

UNIFI中提供了多种解析工具，可帮助鉴定感兴趣的未知质量数。“发现工具”就是其中之一，用户可以使用这款工具提交多个质量数用于批量解析。首先，利用“元素组成”功能分析选定的感兴趣的质量数，然后将所有满足设定标准的推荐化学式提交到谱库搜索。搜索的谱库可以是UNIFI的内部数据库、ChemSpider<sup>4</sup>中的单个数据库或一组数据库，也可以是整个ChemSpider数据库。下载所有潜在谱库匹配的mol文件，并在批量解析的最后环节执行碎片离子匹配。“发现工具”的设置将在下文详细介绍。

“发现工具”的设置：

- 发现参数 – 选择搜索ChemSpider或任何本地UNIFI科学数据库。
- 元素组成 – 分析所有提交至“发现工具”的化合物的元素组成。
- ChemSpider搜索 – 将元素组成的i-Fit大于定义值的所有建议化学式发送到数据库搜索。本研究所示例搜索了ChemSpider中的三个数据库（ChEBI、ChEMBLE和农药常用名）。
- 碎片离子匹配 – 将高能精确质量数碎片离子与自动下载的.mol文件的智能键裂进行匹配，从ChemSpider数据库中找出潜在匹配结果。

将五个感兴趣的质量数（在图5中突出显示）提交到发现工具的结果如图7所示。图7右侧的结果表显示了对五个感兴趣的质量数预测的所有元素组成，以及数据库搜索结果和碎片离子匹配信息。这些结果可以按列标题排序，本例中使用预测强度进行排序。顶部突出显示的结果是候选质量数318.1979，预测该候选化合物的元素组成为 $C_{18}H_{24}FN_3O$ ，数据库搜索的结果为氟唑菌苯胺。利用数据库中氟唑菌苯胺的结构进行碎片离子匹配，子离子谱图中有九个离子与之匹配，质量数误差不超过2 mDa。在高能量谱图数据中，峰的预测强度匹配得分高达77%，表明这一结果具有良好的可信度。突出显示的候选质量数的母离子和子离子的质谱信息如图7左侧所示。

审查发现工具的结果后，用户可以选择“分配”按钮，将这些可能的鉴定结果包含在最终报告中。

用户还可以选择以表格形式显示信息。利用“组分概要”审查两个样品的比较数据时，系统将显示所有强度的“未知样品独有”、“参比样品独有”或“共有”质量数（图4）。

用户只需使用一个简单的筛选器，就能重点关注感兴趣的离子。例如，仅显示未知样品独有、介于100-500 Da之间，且响应值大于定义值的质量数。

在二元比较的组分图（图5）中，组分的质量数显示为棒状，这使用户能够立即观察到并选定未知样品中与参比样品相比不同的感兴趣的质量数。选定后，即可将这些感兴趣的质量数（以黄色框突出显示）直接发送到解析工具包。

从本质上讲，用户可以利用 $MS^E$ 采集、数据组分化和UNIFI来研究、排序和显示数据，以便快速报告。

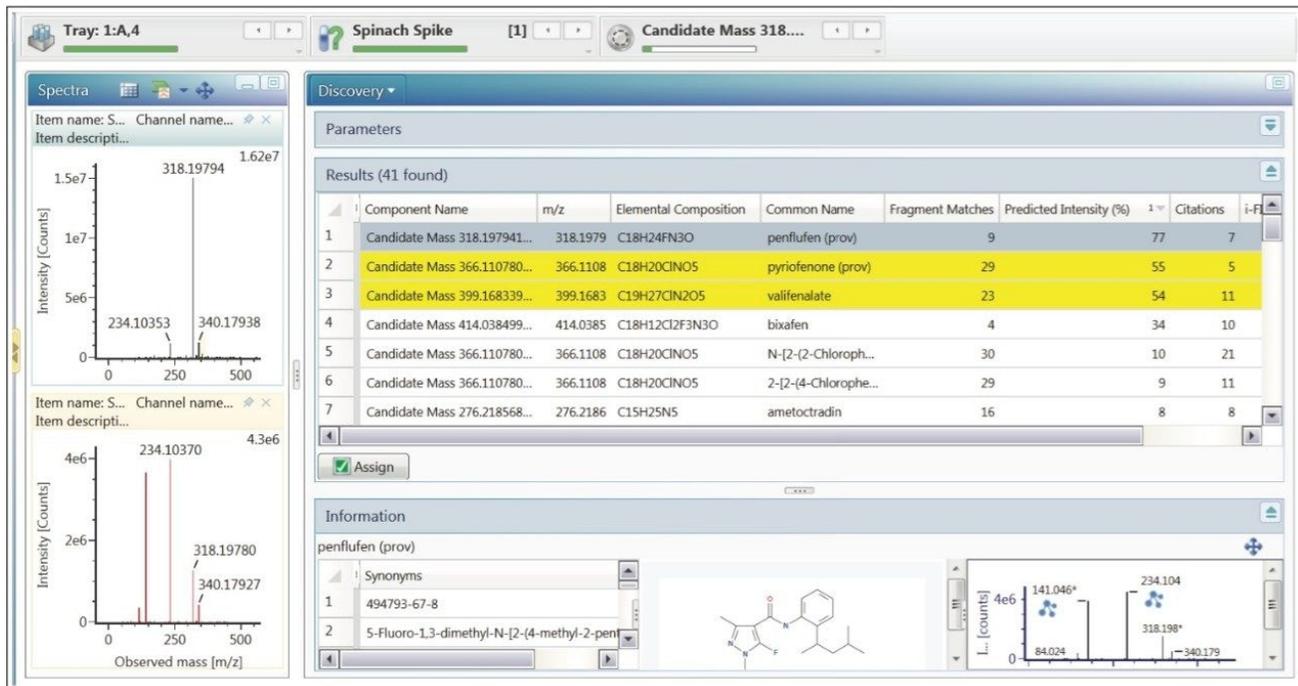


图7.利用二元比较的组分图分离出的五个感兴趣的未知质量数在发现工具中的解析结果（图5）。

利用卤素匹配、二元比较和批量解析，能够鉴定出合作伙伴加标的五种未知化合物。在分析前，合作伙伴并未公开这些化合物（唑啉菌胺、联苯吡菌胺、氟唑菌苯胺、苯啉菌酮和缬菌胺），但在最终审查分析后发现，这些化合物是正确的。

## 特色产品

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

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

SYNAPT G2-Si高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/134740622>>

基于UNIFI的农残筛查应用解决方案 <<https://www.waters.com/134682906>>

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

720005608ZH, 2016年2月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [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](#)