Waters™

应用纪要

使用UPLC-Vion HDMS^{E}对复杂蔬菜水果基质中的农药进行靶向和非靶向筛查

Lauren Mullin, Gareth E. Cleland

Waters Corporation

摘要

高分辨率质谱(HRMS)技术非常适合用来处理大量化合物（非靶向采集），可提供更多的分子信息（碎裂途径、同位素信息、加合物等）。

在最近的食品安全分析中，将离子淌度技术与HRMS结合使用，可根据大小、形状和电荷对离子进行进一步分离。在离子引入离子源后，Vion IMS QTof系统将进行离子淌度分离(IMS)。此方法能够确定化合物的碰撞截面（CCS，单位为Å2）值，该值是反映离子穿过淌度池时平均旋转值的唯一参数。谱图净化是离子淌度数据特有的优势，有助于解析未知化合物谱图并确认已知化合物。

本应用纪要展示了如何结合使用母离子和碎片离子的精确质量数、同位素分布、离子淌度分离和高质量UPLC分离，并利用大型筛查数据库鉴定四季豆、草莓、墨西哥辣椒和小甜椒提取物中的目标农药化合物。此外，我们还利用这种方法鉴定出了蔬菜提取物中存在的一种新型杀虫剂。

优势

- 轻松鉴定法规筛查规定浓度的目标农药
- 使用CCS作为确认化合物的额外依据，通过包含500多种化合物的筛查数据库使用这些值。
- 精确质量数的全谱采集能够确认以前未靶向的其他化合物。

简介

通用术语“农药筛查”通常涉及到复杂的样品和大量的目标化合物。前者来源于所采用的通用提取方法，这种方法能够尽可能加大化合物覆盖范围以及商品生物化学特性的变异性。后者来源于数千种注册使用的化合物。除串联四极杆MS/MS方法外，高分辨率质谱(HRMS)技术非常适合用来处理大量化合物（非靶向采集），可提供更多的分子信息（碎裂途径、同位素信息、加合物等）。在最近的食品安全分析中，将离子淌度技术与HRMS结合使用，可根据大小、形状和电荷对离子进行进一步分离[1]。 在离子引入离子源后，沃特世Vion IMS QTof系统将进行离子淌度分离(IMS)。此方法能够确定化合物的碰撞截面（CCS，单位为Å^2）值，该值是反映离子穿过淌度池时平均旋转值的唯一参数[2]。谱图净化是离子淌度数据特有的优势，[3]有助于解析未知化合物谱图并确认已知化合物。

在本应用纪要中，我们结合使用母离子和碎片离子的精确质量数、同位素分布、离子淌度分离和高质量UPLC分离，并利用大型筛查列表鉴定了四季豆、草莓、墨西哥辣椒和小甜椒提取物中的目标化合物。借助非靶向数据非依

赖型采集方法，我们成功地在小甜椒提取物中鉴定出一种筛查数据库中不存在的、相对较新的替代农药。我们对所有结果进行了相互核对，证实全部准确，并且还鉴定出了此前通过串联四极杆MS/MS分析得到的预期化合物。

实验

在分析样品之前，我们需要完成自动化设置以确保理想的系统性能。只需按一下按钮，即可设置好检测器、分辨率、Lockspray和校正。分析采用了四季豆、草莓、墨西哥辣椒和小甜椒提取物样品，进样体积均为1 µL和5 µL（三个重复样）。如“UPLC条件”部分所述，此处使用了两种不同的色谱方法。在分析样品前后，通过重复进样QC评估一系列参数的稳定性，包括质量精度、CCS值、预期碎片离子形成、响应值和保留时间(RT)。在采集数据时，使用离子淌度分离的全谱采集以及高/低碰撞能量交替的模式(HDMS^E)。采集完成后，根据包含化合物名称、结构、保留时间、预期碎片离子质量数和CCS值（$^+$H离子，以及某些情况下的$^+$Na/$^+$K加合物）的筛查数据库自动对数据进行组分化和处理。在生成数据库值时，使用了方法A的液相色谱条件（见“方法条件”）和溶剂标准品。针对CCS值和RT，使用多个输入值的平均值来代表充分表征的数值。使用UNIFI软件v.1.8进行数据采集、处理和审查。

样品描述

样品提取物由合作伙伴提供，并通过改良的QuEChERS方法进行制备。提取物储存于100%乙腈中，进样前用水按1:1的比例稀释。

UPLC条件

方法A：

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱：	ACQUITY UPLC BEH C_{18}, 1.7 µ

方法A：

	m, 2.1 × 100 mm
柱温：	45 °C
样品温度：	4 °C
流速：	0.450 mL/min
进样体积：	1 µL和5 µL
流动相A：	10 mM醋酸铵水溶液(pH 5.0)
流动相B：	10 mM醋酸铵的甲醇溶液(pH 5.0)
总运行时间：	17 min

梯度：

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B
初始	0.45	98	2
0.25	0.45	98	2
12.25	0.45	1	99
13.00	0.45	1	99
13.01	0.45	98	2

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B
17.00	0.45	98	2

方法B

UPLC系统	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 µm, 2.1 x 100 mm
柱温：	40 °C
样品温度：	4 °C
流速：	0.450 mL/min
进样体积：	1 µL和5 µL
流动相A：	含0.1%甲酸的4 mM甲酸铵水溶液
流动相B：	含0.1%甲酸和4 mM甲酸铵的甲醇溶液
总运行时间：	18.5 min

梯度：

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B
初始	0.4	95	5
0.50	0.4	95	5
3.00	0.4	57	43
13.50	0.4	19	81
14.50	0.4	1	99
16.50	0.4	1	99
16.51	0.4	95	5
18.50	0.4	95	5

MS条件

MS系统：	Vion IMS QTof
电离模式：	ESI+
碰撞能量(LE)：	3 eV
碰撞能量（HE梯度）：	20~55 eV
扫描时间：	0.25 s
采集范围：	50~1200 *m/z*

缓冲气体：	N2
IMS波速：	250 m/s
IMS波高（梯度）：	20～50 V
毛细管电压：	0.8 kV
采样锥孔电压：	20.0 V
离子源温度：	120 °C
电离源补偿：	80
脱溶剂气温度：	550 °C
锥孔气流速：	50 L/h
脱溶剂气流速：	1000 L/h
实时质量校正标样：	亮氨酸脑啡肽(556.2766 *m/z*)
数据管理：	UNIFI科学信息系统

结果与讨论

四季豆、草莓、墨西哥辣椒和小甜椒提取物的鉴定结果

利用筛查数据库提供的高度复杂的数据集，根据多达500多种目标化合物的列表解析所有提取物的全谱样品数据。待查看所有样品后，根据之前执行的LC串联四极杆MS/MS分析对鉴定结果进行相互核对，核对检查鉴定出了所有预期化合物。鉴定结果见图1的小甜椒组分图。浓度范围338 ng/g~10 ng/g以下（称为“痕量”水平）也是通过串联四极杆MS/MS分析得出的。

在某些情况下，我们找到并鉴定了存在于数据库但未经LC串联四极杆MS/MS数据报告的目标农药代谢物（图1）。使用UNIFI软件“查看”部分的筛选条件获得鉴定结果。筛选条件具有灵活性和自动化的特点，由用户自定义，可应用于处理后数据。通过执行软件中的各个工作流程步骤，将一类样品（未知样品、QC样品、标准品等）和上述条件集中到特定视图下，从而将筛选条件完全集成到数据审查中。沃特世应用纪要720005436en详细介绍了UNIFI的筛选条件和工作流程。为减少假阳性结果并提高推测鉴定结果的可信度，此数据集的筛选条件使用了UNIFI筛查数据库中的信息。具体而言，显示的数据均符合图2中列出的标准，即质量数误差、CCS% Δ（来自数据库值）、RT误差（来自方法A的值）以及存在碎片离子。

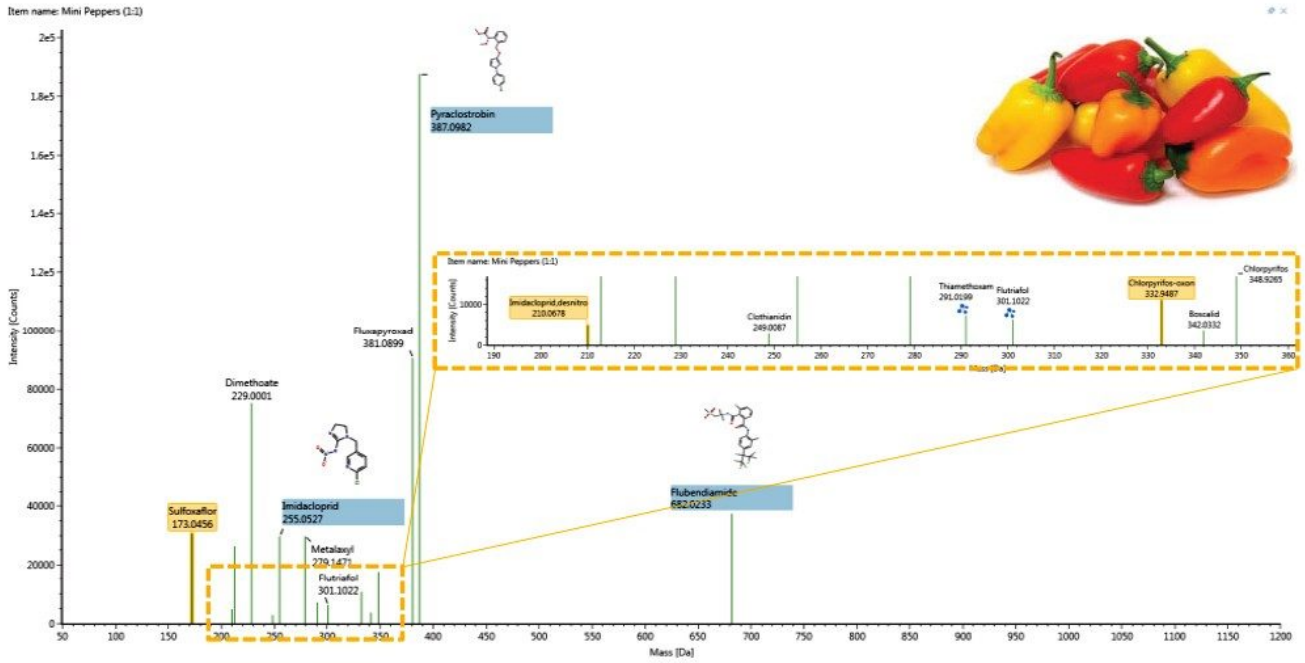

图1.小甜椒提取物的阳性鉴定结果，在串联四极杆*MS/MS*定量分析的所有商品中，小甜椒提取物的浓度范围最广。以质量数(*Da*)为*X*轴，强度（计数）为*Y*轴显示鉴定结果。图中放大了痕量鉴定结果，其中包含*LC*串联四极杆*MS/MS*分析中未纳入筛查范围的两种代谢物（毒死蜱氧化物和去硝基吡虫啉）。

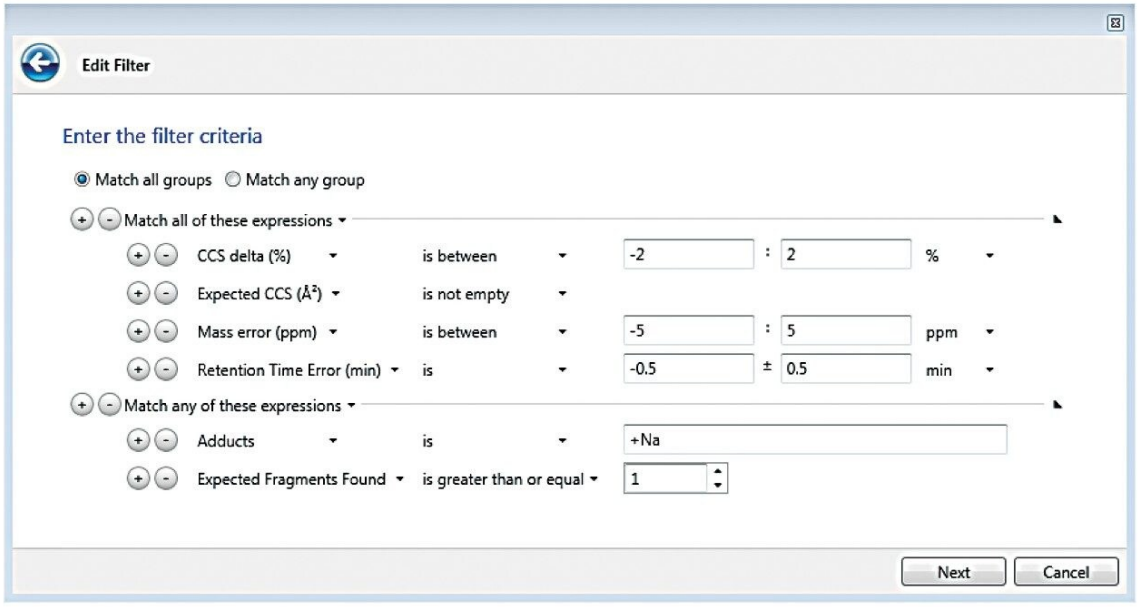

图2.使用*UNIFI*软件的筛选条件获得阳性鉴定结果

尽管我们在避免生成加合物方面已经取得了长足进步，但这种情况在ESI实验中有时还是难以避免。因此，使用碎片离子以外的其他标准（例如CCS）进行鉴定将有助于避免假阴性结果。考虑到$^{+}$Na加合物在某些情况下可能导致结果中不存在预期碎片离子，所以我们可以简单地在筛选条件中执行一个条件功能，要求结果中必须存在预期的碎片离子，或者$^{+}$Na加合物是观察到的主要离子。点击图2中的Match any of these expressions（匹配所有表达）操作符即可完成此操作。图3所示为四季豆样品“查看”选项卡下的筛选条件，其中氟虫双酰胺只显示为$^{+}$Na加合物，无碎片存在，然而，CCS、质量精度和RT等其他关键标准都精确到了规定的标准。筛选条件一旦设定好就会添加到分析结果查看的工作流程步骤中，选择该步骤的同时筛选条件也会自动应用于数据。只有粉唑醇（在小甜椒中含量为亚10 ppb级）的鉴定结果中含有$^{+}$H加合物，没有出现预期碎片；其他所有标准均满足。

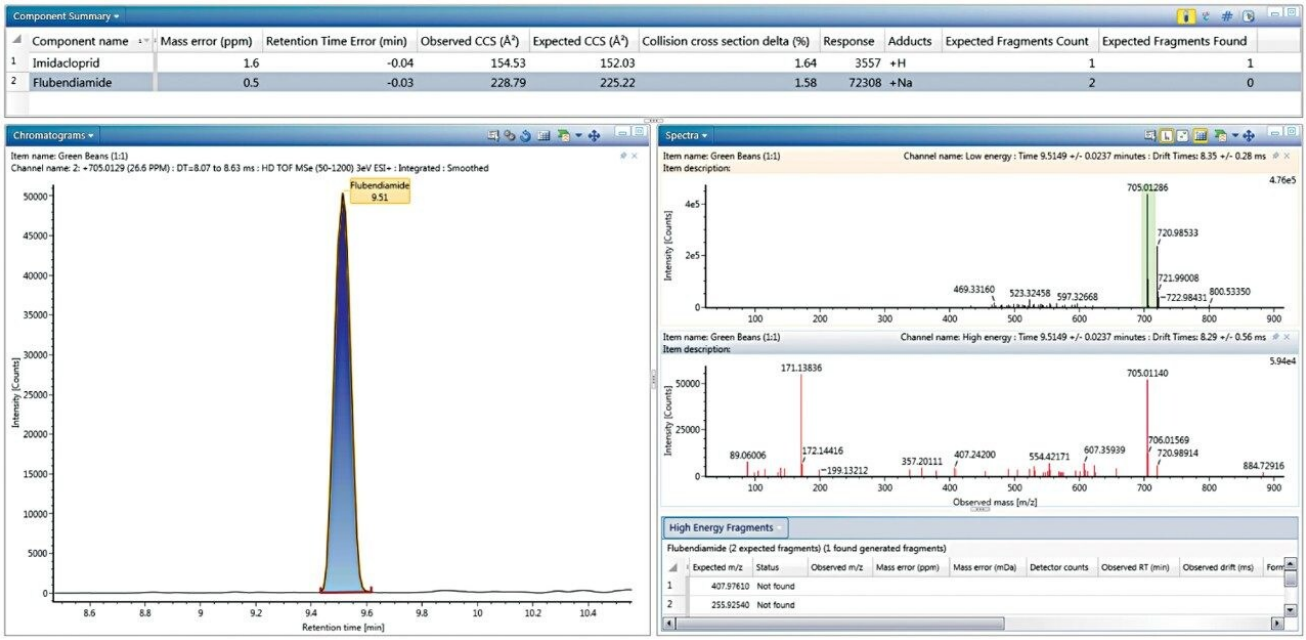

图3.“查看”选项卡显示了四季豆提取物仅存在^{+}Na加合物，并未产生预期碎片离子。

使用不同色谱方法得到的结果

使用LC方法A进行初始分析后，我们提出了另一种方法（LC方法B）。这种方法使用了不同的流动相添加剂（甲酸而非乙酸铵）、色谱柱（HSS T3而非BEH C_{18}）和梯度，试图通过这种机制改善分析结果。在多种分析物中，通过这种方法得到的保留时间明显不同于之前使用的筛查数据库中的保留时间。然而，CCS值是气相分析的结果，并且代表了分子的固有特性，因此两种LC方法得到的CCS测定值无显著差异。图4为方法A和B分析得出的RT和CCS的差异总结，与上述趋势表现一致。使用CCS增加鉴定点有助于减少对实验可变参数（如RT）的依赖。只需取消RT要求，即可立即更改鉴定结果的筛选条件。我们通过添加新的工作流程步骤将筛选条件自动纳入数据审查方法，此举旨在帮助比较两种不同色谱方法分析得出的结果，并通过这两种方法获得准确鉴定。

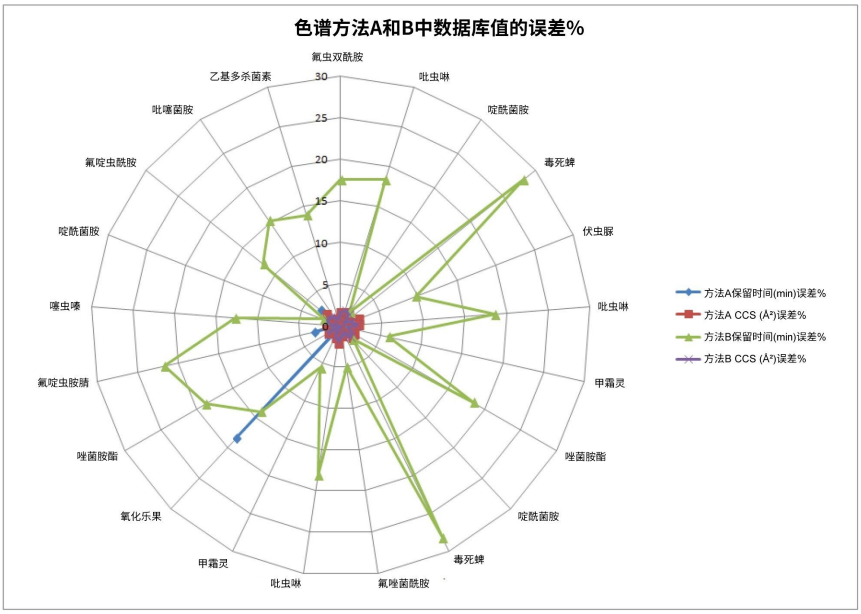

图4.两种分析方法鉴定出的化合物的*RT*（蓝色和绿色）和*CCS*（红色和紫色）与数据库值的百分比误差。由于*CCS*发生在气相中，因此不受色谱方法变更的影响，这也通过方法*A*和*B*比*RT*低的误差得到了印证。

一种新烟碱类替代农药的鉴定结果

引入筛查数据库或在线数据库中可能不存在的新型农药给筛查和监测带来了巨大挑战。除了搜索理论上数量不限的目标离子外，用户还可以使用共有中性丢失、卤素匹配、质量数亏损、二元比较和多变量分析等工具解析未知目标离子的数据。部分这些工具的实用性在以下示例中得到充分展示：我们的合作伙伴在样品中鉴定出了一种新近生产出来的杀虫剂，并向我们指出这种杀虫剂存在于样品中，但却并未列入包含500多种农药和代谢物的搜索库中。

吡虫啉是一种新烟碱类杀虫剂，因为它可能与蜜蜂群的蜂群崩溃综合征(CCD)有关，因此最近在欧洲和北美受到了严格审查[4]。支持数据显示这种相关性确实存在，所以法国[5]和加拿大已经开始禁用吡虫啉等新烟碱类农药[6]。因此，与大多数禁用物质一样，行业里开始产生对于新烟碱类农药替代化合物的需求，要求这些化合物具备相似的作用但毒性更低。为了靶向本研究所用样品中的类似化合物，我们对现有新烟碱类化合物的结构进行了比较，发现了一种可能存在于新型化学制剂中的共有碎片离子。

如图5所示，在吡虫啉、啶虫脒、噻虫啉和烯啶虫胺中观察到含氮环结构有一个氯取代，分子的这部分很可能在碰撞诱导解离(CID)过程中形成碎片。

使用UNIFI筛选条件创建所有数据的查看标准，图中结合使用了共有碎片离子和卤素匹配工具（图5）。此筛选条件同时考虑了完整数据集中已鉴定和未鉴定的组分，以获取低碰撞能量谱图中氯同位素分布模式的组合以及高碰撞能量谱图中质量数为126.0119 (C_6H_5ClN)的碎片。将此筛选条件应用于小甜椒数据后，结果显示一个候选质量数（未分配到目标化合物列表中）、吡虫啉及其代谢物去硝基吡虫啉（图6）。之前的目标分析物筛选条件已鉴定出吡虫啉及其代谢物去硝基吡虫啉，而此筛选条件对其同样适用，因为它们同时展示了单个氯离子和共有碎片离子的卤素同位素分布模式。参照文献对两个候选质量数进行研究，结果发现质量数为289.0554的化合物是最近生产的丁烯酸内酯类杀虫剂氟吡呋喃酮。这是一种灭杀吸食类昆虫的替代农药，它以烟碱型乙酰胆碱受体为靶点[7, 8]，作用机制与新烟碱类化合物相同。如前文所述，虽然合作伙伴在样品中鉴定出这种农药，但该农药却并未包含在我们的原始筛查列表中。因此，本文所述的工具可以快速有效地鉴定氟吡呋喃酮。只需单击右键，即可将化合物添加到UNIFI科学数据库中，并附带一个限定词，表明该化合物是残留物质（如flupyradifurone_incurred green bean）。

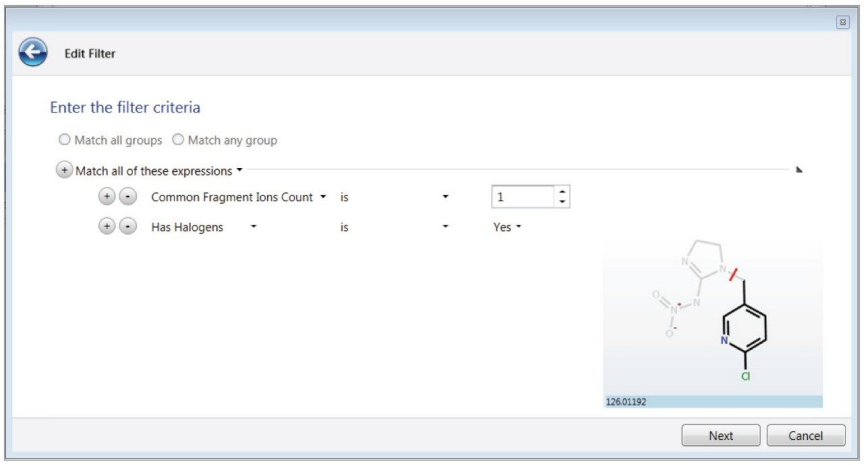

图5.使用*UNIFI*筛选条件特异性查找与接受审查的新烟碱类杀虫剂相似的化合物。分析处理方法中指定了共有碎片离子质量数。方框中展示了常见新烟碱类化合物片段结构（如吡虫啉的结构）以供参考。

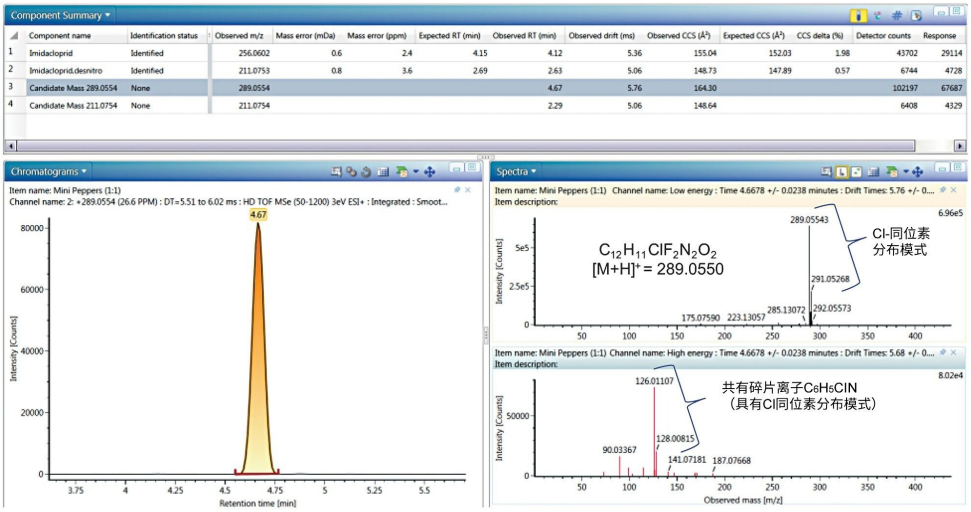

图6.使用图6中的筛选条件得到的*UNIFI*组分鉴定结果汇总，以及突出显示的候选质量数为289.0554的化合物的提取离子流色谱图，经研究，该化合物为农药氟吡呋喃酮；质量数误差为0.4 *mDa/1.4 ppm*）；右下图为*RT*和*DT*校准谱图。

除我们强调的优势外，HDMS^{E}还有一个不容忽视的优势在于它得到的数据比同类MS数据更清晰，如图7中的谱图对比所示。切换图7中突出显示的按钮，可显示保留时间和漂移时间校准的谱图离子。图7还对比了两张谱图，从对比图可以看出，使用基于IMS的谱图净化可以获得更清晰、更易于解析的谱图。

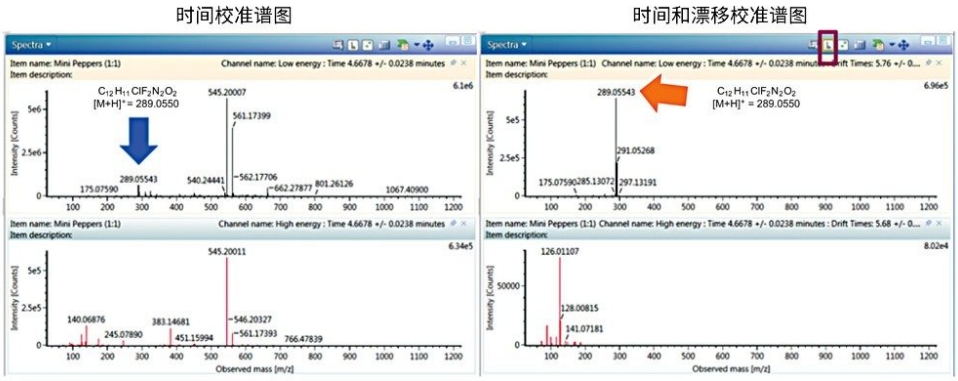

图7.漂移时间(*DT*)和保留时间校准使谱图得以净化。无论是在低碰撞能量谱图还是高碰撞能量谱图中，时间和漂移校准谱图均与*MS/MS*或单标类型数据类似。选中谱图视图上方框中的按钮即可启用该选项。

结论

使用HDMS^{E}方法开展农药筛查实验，可生成信息量丰富的数据集。用户可根据母离子和碎片离子的精确质量数、RT和CCS等鉴定标准轻松筛选和查看数据。在农药筛查中引入IMS技术测量CCS，既可提高化合物鉴定的可信度，还可将其用作筛查实验的附加参数。UNIFI软件无缝集成了CCS表示和对比计算，让用户轻松查看结果。这种UNIFI数据库筛查方法根据全谱图采集结果进行处理，提供了一种自动化方法来探索采集到的综合数据。数据处理中还会自动包含加合物信息，然后整合成化合物信息呈现给用户。最后，使用基于化学特性的智能筛选功能，可以在数据集中搜索非靶标目标化合物。我们利用这种方法鉴定出了蔬菜提取物中存在的一种新型杀虫剂。

参考资料

1. Goscinny S, Joly L, De Pauw E, Hanot V, and Eppe G. Travelling-wave ion mobility time-of-flght mass spectrometry as an alternative strategy for screening of multi-class pesticides in fruits and vegetables.*J Chrom A*.1405: 85–93, 2015.

2. Waters Food and Environment Business Team.The Use of Collision Cross Section (CCS)

Measurements in Food and Environmental Analysis. Waters Technical Note no.720005374EN.May, 2015.

3. Waters Food and Environment Business Team.Using Ion Mobility for Enhanced Spectral Cleanup in Food and Environmental Analysis.Waters Technical Note no.720005375EN.May, 2015.
4. https://www.gouvernement.fr/en/the-national-assembly-votes-in-favour-of-the-ban-on-neonicotinoid-insecticides-in-2018
5. https://www.cbc.ca/news/canada/british-columbia/health-canada-imidacloprid-neonicotinoid-1.3864450
6. Lu CS, Warchol KM, Callahan RA.In situ replication of honey bee colony collapse disorder.*Bulletin of Insectology*.65: 99–106, 2012.
7. Nauen R, Jeschke P, Velten P, Beck ME, Ebbinghaus-Kintscher U, Thielert W, Wolfel K, Haas M, Kunz K, Raupach G. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide.*Pest Manag Sci.* 71: 850–682, 2015.
8. Li Y, Liu X, Wu X, Dong F, Xu J, Zheng Y. Simultaneous determination of flupyradifurone and its two metabolites in fruits, vegetables, and grains by a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method using ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.*J Sep Sci*.39(6):1090–1098, 2016.

致谢

作者衷心感谢FDA（位于美国华盛顿州博塞尔市）的Greg Mercer和William Cooke提供样品。

实际应用解决方案

- McCullagh M, Cleland G, Hanot V, Stead S, Williams J，Goscinny S, Rao R, and Burgess J. Collision Cross Section: A New Identification Point for a “Catch All” Non-Targeted Screening Approach.沃特世应用纪要编号720005055en，2014年5月。
- McCullagh M, Hanot V, and Goscinny S. (2014) Use of Ion Mobility Spectral Cleanup and Collision Cross Section Values to Increase Confidence and Efficiency in Pesticide Residues Screening Strategies.沃特世应用纪要编号720005080en。2014年5月。

- Mullin L, Cleland G, and McCullagh M. Demonstration of Collision Cross Section (CCS) Value Conservation across LC and GC analyses.沃特世技术简报编号720005592en。2016年1月。

特色产品

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

Vion IMS QTof离子淌度四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134845751>

UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801359>

可在线购买

ACQUITY UPLC BEH C18色谱柱, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm, 1个/包 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186002352>

ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱, 100Å, 1.8 µm, 2.1 mm × 100 mm, 1个/包 <https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186003539>

720006120ZH，2017年10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