



食品安全分析汇编

2018



Contents

SCIEX 2018 食品安全分析汇编

➔ 引言	3.
➔ Alex Liu – Market Manager, Food and Environmental Testing	4.
➔ 全球视角——食品分析的全球趋势	6.
➔ 技术概览	9.
➔ KC Hyland – Staff Scientist, Food and Environmental Testing	11.
➔ 粮谷中 26 种真菌毒素的定量分析检测	14.
➔ SWATH® 技术应用于国标 GB 2763-2016 中 210 种农药的筛查和定量分析	19.
➔ SWATH® 技术应用于水果蔬菜中农残筛查的解决方案	24.
➔ 一种稳定且灵敏的非生化方法直接分析食品和环境样品中的极性农药	30.
➔ 茶叶中 222 种农药残留的 LC-MS/MS 快速定量和筛查方法	37.
➔ 快速测定厨房用具，染制品以及食品包装材料中的 33 种初级芳香胺	40.
➔ 使用 SCIEX X500R QTOF 系统，结合非靶向 SWATH® MS/MS ^{ALL} 采集与高选择性 MRM ^{HR} 分析组织中的兽药	47.
➔ 使用 LC-MS/MS QTRAP® 4500 系统同时分析烘焙食品和生食产品中的 12 种食品过敏原检测	51.
➔ 利用 SCIEX QTRAP® 4500 系统建立假羊肉的检测方法	56.
➔ 高分辨质谱 X500R 在保健品非法添加检测的应用	61.
➔ X500R 在植物食用油中的真伪鉴别和产地溯源分析	68.
➔ 高分辨质谱 X500R MRM ^{HR} 对食品接触材料中 PFAS 类化合物的检测	76.

引言

SCIEX 2018 食品安全分析汇编

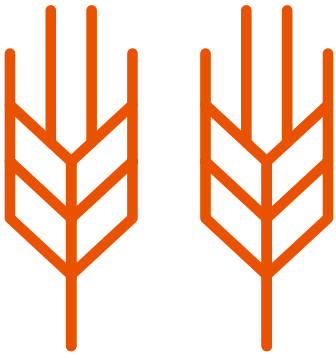
食物是生命不可或缺的一部分，其成分分析主要包括两部分：食物中所含分析物的定量和鉴定。这些分析物可能是营养成分，也可能是对身体健康来说非常重要的成分，通过定量测定可以确定哪儿或哪些成分还需要补充。

而分析测定这些成分对保持消费者的信心也很重要。供应商的产品必须确保可以安全食用，没有农药、霉菌毒素及其他潜在污染物。

现在质谱法是被广泛应用的首选分析方法，可以检测并定量营养成分和污染物。从定量婴幼儿奶粉中的维生素或补充维生素的药物，到检测超低浓度的污染物以确保食品符合监管机构的严格要求，液相色谱串联质谱法能够提供可靠的定性和定量结果。

SCIEX 提供了从仪器到软件整体的解决方案，操作简单、并快速获得数据结果。在全球各地，食品检测的要求根据常见的污染物和食品文化趋势而各不相同。本食品汇编展现了 SCIEX 仪器在分析食品中的营养成分以及分析除草剂和农药等污染物中的应用，侧重于食品行业中使用质谱法的特定应用。

© 2018 AB Sciex. 仅限研究使用，不可用于诊断。
AB SCIEX 以 SCIEX 的名义开展业务。本文提及的商标归 AB Sciex Pte.Ltd. 或其各自的所有者所有。
AB SCIEX™ 已获得使用许可。文档编号：RUO-MKT-03- 8250-A



Alex Liu

市场经理
食品和环境检测

食品行业是一个复杂的市场，为实现提供安全食品的目标，需要克服许多挑战。提供给公众的任何产品都必须既营养又安全。

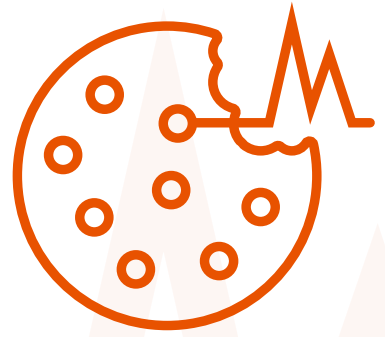
食品行业迫切需要鉴定并定量食品样品中的一切成分。在从田间到餐桌的整个过程中，农药或除草剂等污染物有很多机会进入供应链。因此，食品科研人员必须利用强大的工具，可靠地检测和精确地定量分析食品样品中的污染物或营养成分。

食品包含各种不同的化合物，例如糖、油和脂肪。在这些混合物中，鉴定和定量这些化合物至关重要。它们可能是营养成分或维生素，为消费者提供准确的营养信息；或者追踪农药或除草剂污染物，这些必须提前鉴定，以免发生污染后再予以召回。因此，任何分析仪器都必须协助食品科研人员，向他们提供信息，帮助解答以下问题：这种食品适合公众消费吗？

污染物向食品科研人员提出了挑战。这些化合物结构不同，通常只有痕量浓度。因此，需要超高灵敏的检测仪器，能够根据单一样品中的潜在污染物数据库筛查样品。SCIEX 仪器能够满足这些要求。例如，X500R QTOF 系统具有革新性的检测功能，能够检测出样品中未知的分子，提供满足现在和将来食品检测实验室需求的解决方案。



“在从田间到餐桌的整个过程中，农药或除草剂等污染物有很多机会进入供应链。”



多年以来，阻碍食品行业采用质谱法的因素已被一一克服。最初，普遍对质谱法有一种误解，认为此技术不直观或使用困难。现在广泛认为它是最适合食品分析的分析方法，而 SCIEX 软硬件以易于学习和使用的特点赢得了广泛赞誉。为简化用户体验，流程在不断改进，包括自动分析或解读数据，从而直接向用户提供简单的报告，精确描述食品样品中存在哪些化合物。

食品分析是一个挑战性的过程。全球都在使用新型农药。必须鉴定这些农药，防止它们进入食品供应链，避免发生恐慌性污染事件，比如 2008 年的三聚氰胺和 2017 年的芬普尼丑闻。此外，发达国家和发展中国家的法规和法律变化也要求检测方法必须不断发展。

我们预计，接下来几年内对创新技术的需求会越来越大。新型农药的引入需要新的检测方法和流程。此外，行业要求更多可以部署于

田间的仪器，以便尽早分析获取的样品，或者直接集成到供应链中。但是，目前的便携式仪器必须牺牲准确性与可靠性，从而削弱了行业的检测能力，这些错误必须不惜一切代价予以避免。不过，便携式设备有利于改变分析食品的方式和地点。分析应走出实验室，直接进入田间或供应链，靠近食品来源直接监控污染。食品行业供应商、消费者和监管机构的需求不断变化，这就需要改变质谱法的使用方式，SCIEX 将提供促进这些改变所需的仪器。





全球视角

食品安全分析全球趋势

不同国家的食品检测要求不同，有些地区对新兴检测领域的分析需求可能很旺盛，例如北美对大麻的分析，日本对食品中过敏原的分析。我们的专家从全球视角来研究地区性食品检测趋势。



Oscar Cabrices，市场开发经理，食品、饮料和法医检测市场，美洲地区

美洲的食品安全依赖于全面鉴定最常见的污染物：农药、兽药、霉菌毒素和其他类型的残留物。但美国食品药品监督管理局 (FDA) 新法规对污染物最大允许残留量的要求愈发严格，实验室的仪器必须能够检测每一种分析物，即使是超低浓度的分析物。因此，科研人员想找到能够在单个简化的工作流程中分析多种分析物的工作流程和方法。

关于具体的设备，食品检测仍然倾向于液相色谱质谱技术。特别是，三重四极杆 (QQQ) 已经成为食品检测实验室采用最广的质谱仪，这类检测器可以提供靶向和选择性的污染物检测方法。随着消费趋势的变化，食品检测行业越来越需要全面了解商品社会每天的消费情况，此领域的著名科学家在研究下一代技术，即高分辨率质谱法。在 SCIEX，我们团队最重要的职责之一是倾听客户心声。根据客户的反馈，我们开发出了革命性的 X500R 四极杆飞行时间 (QTOF) 质谱仪，为科研人员提供台式解决方案，带来更高一级的特异性，用于从食品样品中获取所有相关信息，例如：污染物、残留、过敏原和营养成分等。



Paul Winkler，市场开发经理，环境、工业和大麻市场

大麻食品在美国和世界其他国家 / 地区日益增多。这种增长是药用和娱乐性大麻逐步合法化的直接结果。为了应对这些变化，许多食品（如巧克力、饼干和饮料）都在加入大麻提取物。在分析含有大麻的食品时，食品科研人员必须进行两项主要分析。第一，根据标签的要求，必须确定食品中的大麻二酚 (CBD) 和四氢大麻酚 (THC) 含量，让消费者清楚他们使用的产品成分。第二，必须检测残留的农药污染物。现在经常使用 LC-MS/MS 技术来克服这两大挑战。困难之一在于不同国家 / 地区和州政府指导的立法不同，这增加了检测的复杂性，因此更有必要使用灵敏度高，适用性强的稳定检测方法。

为解决此市场的分析需求，SCIEX 开发了能够满足所有化合物要求的方法，只使用 LC-MS/MS 就能完成。大麻检测市场越来越重视污染物检测，而 LC-MS/MS 是最适合此类分析的技术。它能够简化现有的实验室流程，结合创新的 SCIEX 仪器和方法，让用户拥有应对未来挑战的最佳工具。



Ashley Sage, 应用市场开发高级经理, 欧洲、中东、非洲和印度地区

常规食品安全检测的主要目的是保护消费者。近几年, 多宗著名的公共食品丑闻促成了更严格的法律出台, 这些法律规定了食品中农药、霉菌毒素和兽药残留的上限。2017 年全欧洲曝光, 在鸡蛋和鸡肉中, 一种常用的农药(芬普尼) 残留超过安全限制, 导致数百万枚鸡蛋被销毁。食品行业的另一个关注领域是食品掺假, 蓄意将食品或商品变成价值更低的产品后出售。2013 年英国就出现了一个著名的案例: 马肉掺假, 当时发现很多肉制品实际包含的是马肉, 却宣称是价值更高的牛肉。

为抵御这种食品污染, 大家通过质谱法来检测食品欺诈和掺假, 颠覆了食品分析行业。今天, 质谱法能在一次样品分析中筛查 700 多种农药, 采用的高端仪器能够检测浓度仅为万分之一的分析物。这些分析在行业中不可或缺, 适用性强的方法和仪器可帮助最大程度地降低未来发生食品安全丑闻的概率。



Kerong Zhang, 市场开发高级经理, 食品、环境和法医市场, 中国地区

全球化催生了更多国际食品贸易, 在此过程中, 使用多残留分析检测农药和兽药至关重要。中国的食品安全主要侧重中农药和兽药残留的分析。但在最近, 霉菌毒素引起了人们的关注, 因为它们对人畜的安全有很大的威胁。

为了应对这些挑战, 2017 年, 中国政府对谷物和食品安全做出了多项重要安排, 旨在组建专门的检查和监控团队, 提高粮食质量和安全的监管等级。

为了应对这些变化, SCIEX 专门为此开发了仪器和方法, 以满足食品科研人员的要求。特别值得一提的是, SCIEX 开发的用于检测霉菌毒素、农药、兽药和其他污染物残留的各种 vMethods™ 已在食品实验室中轻松实施并使用。



Jason Neo, 营销和应用总监, 亚太地区

由于食品和商品中出现了许多新的污染物, 亚太地区的食品科研人员开始认可质谱法是最适合食品分析方法。在这一地区, 大多数食品和饮料筛查都是为了检测残留污染物, 例如农药和兽药, 特别是检测 PFAS (全氟辛酸磺酸) 或草甘膦等新兴污染物的需求越来越大。此外, 分析趋势还受到世界各地不同事件的影响。例如, 2017 年欧洲的芬普尼丑闻使韩国产生了类似的需求, 需要能够检测潜在芬普尼污染的方法。

发展中国家的研究人员从传统的 HPLC 法转向质谱法, SCIEX 将继续调整其仪器和方法, 以满足客户和用户的需求。例如, X500R 仪器是筛查潜在未知污染物的理想工具。质谱法现在是在, 以后也仍然是帮助科研人员抵御未来食品欺诈的重要技术。



Yuka Ikoma , 市场开发经理, 食品、环境和法医市场, 日本地区

日本食品行业使用质谱法主要是检测农药和兽药。但不同食品分析领域使用的仪器不同, 近几年, 需要的检测方法呈现出明显的趋势。市场更加需要能够更灵敏地检测过敏原, 因此 SCIEX 仪器和方法越来越受欢迎, 因为它功能强大、高度灵敏, 能够检测这些分析物。此外, 日本社会的老龄化也让人们更加关注延长寿命预期的解决方案。这意味着 FOSHU (特定保健用食品) 等食品研究领域变得越来越流行, 在未来几年, 这种需求只会越来越大。

为了应对已知/未知污染物的非靶向分析需求强烈, SCIEX 的 X500R 等仪器和 SWATH® 数据采集方法能帮助客户实现这方面的检测需求。



Chris Hodgkins , 市场开发经理, 澳大利亚和新西兰地区

在澳大利亚和新西兰以及整个世界, 人们的食品安全意识越来越强, 他们渴望优质的食物和迎合特定饮食需求的食品。无麸质产品市场持续增长, 食品污染物和其他过敏原也随之增长, 考虑到消费者的风险, 准确定量这些分析物非常关键。澳大利亚和新西兰一直以出口高质量的食物而著称, 但现在正慢慢转变为当地对同样优质产品的需求。结果, 现在更加要求了解来自食品包装的潜在接触污染, 因此除了食品本身, 与包装检测相关的需求也在增长。

为解决此地区的消费者和科研人员的需求, SCIEX 正在帮助开发能够解决行业需求的方法, 以及我们客户期望的性能高超、功能强大的仪器。QTRAP® 和 Triple Quad™ 系统, 特别是 6500+ 型号, 深受食品检测科研人员的欢迎。X500R 系统可为常规食品检测实验室提供非靶向分析功能, 在市场上也受到越来越多客户的青睐。

技术 概览

全球的食品科研人员需要相信他们能够检测食品样品中的一切成分，因此需要能够帮助他们提供克服这些挑战的设备。

食品科研工作者日常检测可能需要使用强大的分析仪器来监控食品样品，确保致命污染物达到最小痕量，或者鉴定并定量食品中的营养成分，为消费者提供准确的信息。

因此，高效、精确、可靠的仪器成为食品供应链的关键部分，以便确保提供给公众的食品安全而营养。

为确保食品质量，符合食品标准要求，SCIEX 设计并开发了一系列业内最先进的质谱仪，这些仪器能够提供可靠而准确的结果。经过我们自己的研究，这些工具已经在整个食品供应链的各种环境中进行了测试，从困难的极性农药检测到含大麻产品中大麻的定量。

下面简要介绍我们在快速扩展的食品科学领域使用的部分最新技术，以及它们可以产生的激动人心的结果：

X500R QTOF 系列

食品科研人员需要能提供高通量和灵敏的检测设备，以快速验证食品样品。为满足这些需求，SCIEX 开发了革命性的 X500R 系列 QTOF 质谱仪。其主要功能包括：质量精度更高，在靶向化合物的常规质谱法 (MS) 定量中选择性更好，结合灵敏的快速 MS/MS 数据采集，可提高数据质量，确保全面检测未知成分。X500R 系列的 Turbo V™ 离子源，其离子化性能深受行业专业人士的好评。

此外，SCIEX X500R 系列还有独立的校准液输送路径，这样可以确保长期运行中质量校准高度可靠。这些功能综合到一起，为平台提供了食品分析物高通量鉴定和定量所需的速度与质量精度。凭借这些优点，X500R 系统非常适合筛查包含未知分析物的样品。要详细了解使用 X500R 系列取得的成果，请参阅本汇编中的相关技术说明。



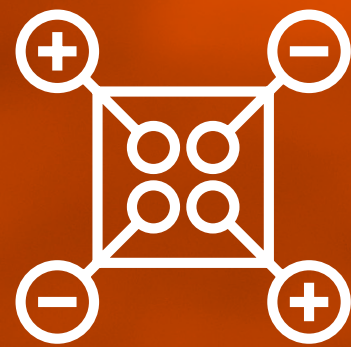


SCIEX Triple Quad™ 3500 系统

Triple Quad 3500 系统专为食品和环境检测实验室而设计，可为多个样品提供一致的结果。采用大名鼎鼎的 Turbo V 离子源，对样品进行高效的离子化，提供可靠的样品分析。即使是脏样品也可用于本机器，因为 Curtain Gas™ 接口抗污染能力强，所以常规维护频率很低。一次进样可以分析数百种分析物，是高通量检测实验室的优秀助手。

QTRAP® 4500 系列

SCIEX QTRAP 4500 LC-MS/MS 系统在 4000 QTRAP 平台的基础上进行了智能重新设计，可以帮助食品科研人员对广泛的分析物进行迅速而可靠的高通量筛查。QTRAP 4500 具有稳定、快速和定量灵敏的特点，非常适合需要检测痕量分析物的情况，常用于检测农药或污染物残留。像 X500R 系列一样，它也拥有 Turbo V 离子源 -LC-MS/MS 离子化的黄金标准。此外，使用 4500 时，研究人员可以最大发挥实验室的产能，提供优质



的定量。得益于强大的 ScheduledMRM™ 算法和 Curved LINAC® 碰撞池设计，它还能提高数据质量，确保不遗漏色谱峰，实现最佳的灵敏度。

QTRAP 6500+ 系统

对于涉及复杂食物组分的更困难、更具挑战性的食品应用，需要更灵敏的仪器。QTRAP 6500+ 系统是 SCIEX 最快速、最灵敏的 QTRAP 系统，采用新型的 IonDriver 技术，可以提供更强的选择性和更高的定量水平。它能够消除背景干扰物，简化定量分析，且具有高选择性。这款仪器扩展了 LC-MS/MS 的边界，为实现全面的食品残留物监控提供了简单的方法。





KC Hyland

技术研究员
食品和环境检测

KC Hyland 是 SCIEX 食品和环境部门的全球技术研究员，位居 SCIEX 创新的最前线。在这里，她说明了质谱法检测多年来的变化。

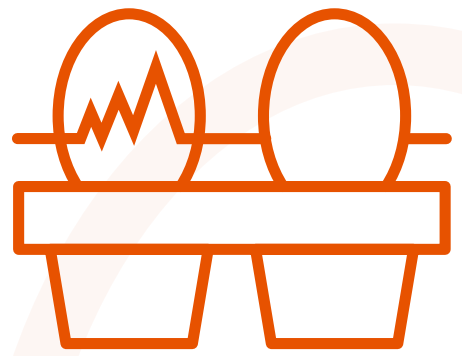
消费者安全是食品分析的推动力，质谱法是常见的分析工具，用于检测食品中许多不同类别的残留污染物。其中一个类别就是霉菌毒素，它是食品中的真菌和霉菌产生的毒素。霉菌毒素分析也有助于说明质谱技术曾经如何发展，以及将会如何随着仪器和方法的进步及创新演变。

最初，霉菌毒素检测采用靶向分析，质谱法只分析样品中可能存在的表征霉菌毒素组合。这种传统的靶点检测和定量方法在方法开发时很耗时，可以报告的答案范围也有限。虽然它仍然是霉菌毒素和其他残留物分析的主流方法，但技术的进步在不断扩展这些分析的功能。

目前，创新已将质谱技术从靶向分析推进到非靶向分析或筛查分析。这一变化在技术上同时开始了两方面的变革。首先，仪器变得更加灵敏，意味着可以鉴定丰度更低的霉菌毒素，并且扩展了已知毒素库。其次，非靶向分析不再需要单独分析每种毒素。科研人员可以使用专门设计的仪器筛查样



“消费者安全是食品分析的推动力，质谱法是常见的分析工具，用于检测食品中许多不同类别的残留污染物。”



从靶向分析到筛查分析再到代谢物检测，这一发展过程长达数十年，但它不仅限于食品行业或霉菌毒素检测。事实上，还有多个其他领域受益于非靶向分析，包括兽药检测、农药鉴定和环境分析。越来越明显的是，质谱法是未来食品分析的基本方法。



品，并鉴定未知的分析物。例如，SCIEX X500R QTOF 系统已成功用于本汇编种详细介绍的多种分析物筛查方法。

但创新不仅限于今天。食品代谢组学是食品研究人员越来越热衷的一个领域。这些毒素一旦进入食品并被代谢，科研人员就可以鉴定和定量这些分析物，它们通常以超低浓度存在。代谢组学研究分析与食品分析之间的连接是此领域的一个新课题。虽然这两个学科的全面整合尚需时日，但食品组学强调潜在协作领域，将是未来数年一个迫切的食品研究和分析领域。



Tech Notes

➔ 粮谷中 26 种真菌毒素的定量分析检测	14.
➔ SWATH® 技术应用于国标 GB 2763-2016 中 210 种农药的筛查和定量分析	19.
➔ SWATH® 技术应用于水果蔬菜中农残筛查的解决方案	24.
➔ 一种稳定且灵敏的非衍生化方法直接分析食品和环境样品中的极性农药	30.
➔ 茶叶中 222 种农药残留的 LC-MS/MS 快速定量和筛查方法	37.
➔ 快速测定厨房用具，染制品以及食品包装材料中的 33 种初级芳香胺	40.
➔ 使用 SCIEX X500R QTOF 系统，结合非靶向 SWATH® MS/MS ^{ALL} 采集与高选择性 MRM ^{HR} 分析组织中的兽药	47.
➔ 使用 LC-MS/MS QTRAP® 4500 系统同时分析烘焙食品和生食产品中的 12 种食品过敏原检测	51.
➔ 利用 SCIEX QTRAP® 4500 系统建立假羊肉的检测方法	56.
➔ 高分辨质谱 X500R 在保健品非法添加检测的应用	61.
➔ X500R 在植物食用油中的真伪鉴别和产地溯源分析	68.
➔ 高分辨质谱 X500R MRM ^{HR} 对食品接触材料中 PFAS 类化合物的检测	76.



粮谷中 26 种真菌毒素的定量分析检测

Xiaoyuan Shi¹; Wan Wang²; Jeremy Dietrich Netto³
¹SCIEX, China; ²Bonna Agela, China; ³SCIEX, Singapore

真菌毒素是由多种真菌在成长过程中产生的有毒次级代谢物，各种食品和农产品都会不同程度受到真菌毒素的污染，并被公认为严重威胁人类和动物的健康。世界卫生组织将真菌毒素纳入食品安全体系重点监测内容。许多国家已经制定了真菌毒素检测和分析的方法及其允许的最高限量标准。在中国，粮谷中的真菌毒素限量受到 GB2761 的监管。在欧盟，EC 181 /2006 和 EC 116 /2007 规定了真菌毒素的限量。食品和环境分析法规要求采用验证性技术对污染物进行分析。因此，需要一种强大而快速的分析方法检测样品中低浓度水平的真菌毒素。近年来，LC-MS/MS 越来越受到人们的青睐，利用其在一次进样可以分析更广泛的化合物的能力，并结合多反应监测（MRM）的高选择性和高灵敏度，建立一套同时分析粮谷中 26 种真菌毒素的定量方法，为真菌毒素的检测提供简单快速的解决方案。

传统上，不同种类的真菌毒素（比如黄曲霉毒素，单端孢霉烯族毒素等）需要不同的样品前处理技术，这使得样品制备过程既费时又费力。本文提出了一种简化的样品前处理流程，通过专用净化柱一步过滤实现样品净化的目的，并将其与超高效液相分离和高灵敏度的质谱检测结合起来。

主要优势

- 提供一套完整的 LC-MS/MS 方法，同时分析谷物样品中的 26 种常见真菌毒素残留。正负模式切换确保分析物的最佳覆盖。

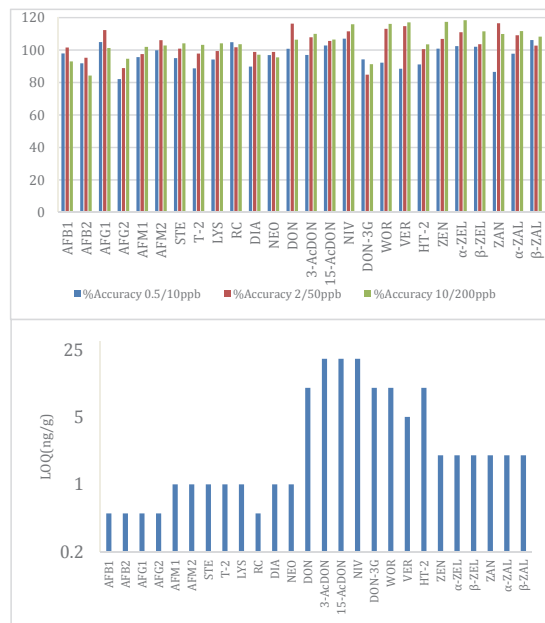


图1. 26种真菌毒素的回收率和定量限。所有真菌毒素的定量限（LOQ）在0.1ng/g和5 ng/g之间。低、中、高浓度的加标回收率在82%到118%之间。这些结果表明，该方法具有良好的灵敏度和准确性。



- 简化了提取过程，省去了额外的净化步骤，节省了分析前端的时间和劳动力。
- 验证了不同的粮谷基质，灵敏度高、重复性好。
- 所有真菌毒素的定量限在0.5 µg/kg到20 µg/kg之间。所有的化合物定量限都满足行业标准的 yêu cầu。

实验流程

样品前处理

根据 vMethod SOP (P/N 5060674) 进行样品制备。首先对谷物样品 (玉米、大米、小麦等) 进行粉碎处理，用乙腈和水的混合溶液提取 2.5g 样品。用离心机离心得上层清液，通过一种含有专门化学吸附剂的 Cleanert® MC 真菌毒素专用柱 (Agela, P/N ZS-MYT10-B) 对粮谷样品进行了净化。然后将滤液吹干，复溶后进行 LC-MS/MS 分析。

液相条件

采用 SCIEX ExionLC™ AD UHPLC 系统进行液相色谱分离。色谱柱：Phenomenex Kinetex C18 柱 (100mm × 2.1mm, 1.7 µm, P/N 00D- 4475 -AN)。进样体积：20 µL。流动相 A 为 0.1% 甲酸水，流动相 B 为 0.1% 甲酸甲醇。

表1. 液相梯度洗脱。流速0.3 mL/min，包括平衡时间，液相总运行时间为13min.

时间 (min)	%B
1.0	3
2.0	10
4.0	50
9.0	80
9.1	99
11.0	99
11.1	3
13.0	3

质谱条件

质谱采用 SCIEX Triple Quad™ 3500 系统。

离子源为 ESI 源；

扫描方式为 Scheduled MRM™ 采集模式，正负离子同时扫描；

IS 电压：5500 V (+) / -4500 V (-) ；

离子源温度为 550°C。

结果与讨论

对于每个分析物，都有两个离子对确保定量和定性结果的准确性，避免出现假阳性 (表 2) 。在一次进样过程中，为了监测很多的离子对，采用 Scheduled MRM™ 采集模式，预设保留时间，在短时间窗口内采集单个离子对。因此，在任何一个时间点上，同时采集的离子对数量显著减少，使每个分析物的占空比大大增加。结合 Scheduled MRM™ 和快速极性转换，进一步扩展了真菌毒素的化合物列表，避免了多次进样，大大降低了样品分析时间。26 种真菌毒素的色谱图如图 2 所示。0.6 秒的 total scan time 确保了每个化合物峰至少采集 12 个数据点，从而获得卓越的准确性和重现性。用 5/50ng/mL 标准品溶液测试系统的适用性，并连续进样三次。计算各化合物峰面积的 %CV，%CV 均小于 15%。

对于样品制备，提出了一种简化的样品净化方法。用一种真菌毒素专用柱 (Cleanert® MC, Agela) 来替代免疫亲和柱。它无需活化、洗脱和淋洗，一步过滤实现净化。它不仅缩短了样品的制备时间，而且节省了成本。图 3 是样品净化前后的比较，结合 LC-MS/MS 分析可以更准确地定量。

确定了分析物的定量限和线性范围。由于基质抑制效应，采用基质匹配曲线对未知样本进行定量。以 Aflatoxin B1 (AFB1) 和 Deoxynivalenol (DON)

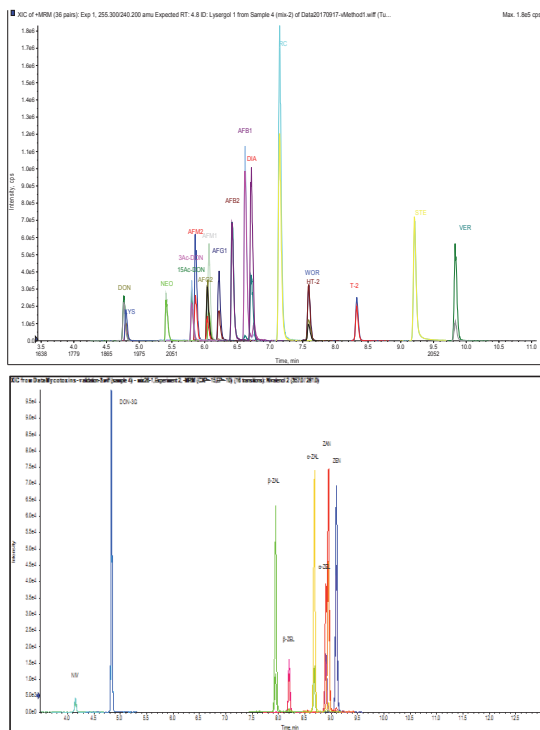
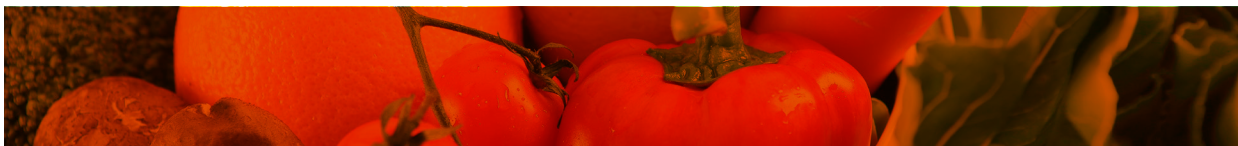


图2. 提取离子色谱图，在ESI正模式（上图）采集18种真菌毒素和在ESI负模式（下图）采集8种真菌毒素。在一次进样过程中同时采集正离子和负离子，使所有26种真菌毒素在一个数据采集方法中被分析。

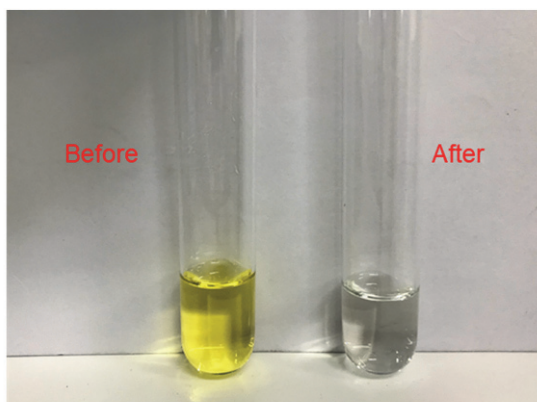


图3. 样品净化。Cleanert® MC柱净化前后样品提取液比较。净化样品可以减少基质干扰，并有助于保持仪器性能。

为例，该方法重复性好，线性回归系数均大于0.99（图4），根据每种化合物在仪器上的灵敏度不同，所有真菌毒素的定量限在0.5 ng/g到20 ng/g之间。低、中、高浓度加标样品的回收率在80%~120%之间（图1）。

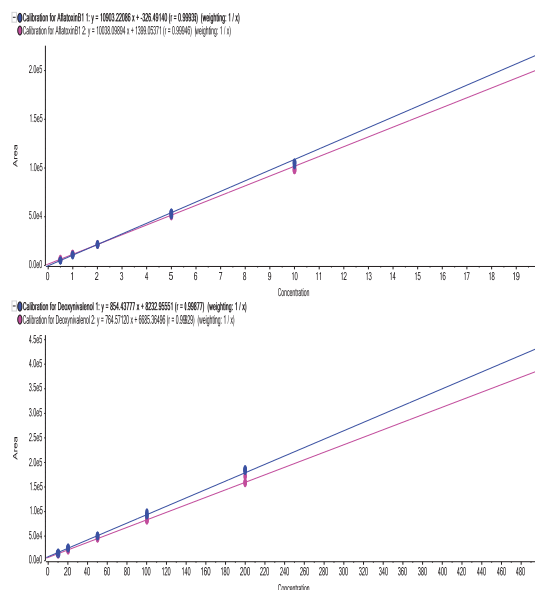


图4. AFB1（顶部）的校准曲线从0.5 ng/mL到20 ng/mL和DON（底部）的校准线从10到500ng/mL。每个化合物监测了两个离子对：定量离子对（蓝色）和定性离子对（粉色）。两种代表分析物的r值均为>0.99，显示了极好的线性范围和分析响应。

结论

开发并验证了一种快速、可靠的检测谷物中26种真菌毒素的方法。采用快速净化方法对26种真菌毒素进行了覆盖。SCIEX ExionLC™ AD超高效液相分离系统结合SCIEX 3500质谱系统进行数据采集，Scheduled MRM™和快速极性转换结合的数据采集方式提供了较高的选择性、灵敏度和重现性。在不

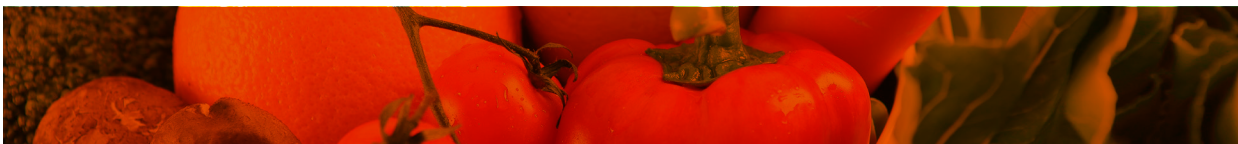


表2. 26种真菌毒素的离子对和保留时间列表。

Compounds name	RT(min)	MRM (primary, quantifier)	MRM (secondary, qualifier)
AflatoxinB1(AFB1)	6.62	313.1>285.1	313.1>241.1
AflatoxinB2(AFB2)	6.43	315.1>287.1	315.1>259.1
AflatoxinG1(AFG1)	6.22	329.1>243.2	329.1>214.9
AflatoxinG2(AFG2)	6.05	331.1>245.1	331.1>189.1
AflatoxinM1(AFM1)	6.07	329.0>273.1	329.0>268.9
AflatoxinM2(AFM2)	5.86	331.1>273.1	331.1>285.1
T-2 toxin(T-2)	8.32	484.2>305.3	484.2>185.1
Verruculogen(VER)	9.84	534.3>392.3	534.3>191.1
Neosolaniol(NEO)	5.41	400.2>185.1	400.2>305.2
Wortmannin(WOR)	7.59	447.2>345.2	447.2>285.2
Roquefortine C(RC)	7.13	390.3>193.1	390.3>322.2
Sterigmatocysin(STE)	9.19	325.1>310.1	325.1>281.0
Lysergol(LYS)	4.80	255.3>240.2	255.3>197.2
Diacetoxyscirpenol (DIA)	6.70	384.2>307.2	384.2>105.1
HT-2 Toxin(HT-2)	7.59	442.1>263.1	442.1>215.0
Deoxynivalenol(DON)	4.76	296.9>249.1	296.9>231.1
3-Acetyl Deoxynivalenol (3-AcDON)	5.80	339.0>231.0	339.0>203.0
15-Acetyl Deoxynivalenol (15-AcDON)	5.80	339.1>321.3	339.1>137.2
Zearalenone(ZEN)	8.90	317.1>175.1	317.1>131.1
-Zearalenol(-ZEL)	8.70	319.2>160.1	319.2>130.0
-Zearalenol(-ZEL)	8.05	319.2>160.1	319.2>130.0
Zearalanone(ZAN)	8.73	319.2>275.2	319.2>205.1
-zearalanol(-ZAL)	8.49	321.2>277.2	321.2>303.2
-zearalanol(-ZAL)	7.80	321.2>277.2	321.2>303.2
Nivalenol(NIV)	4.10	357.0>311.0	357.0>281.0
Deoxynivalenol-3-Glucoside (DON-3G)	4.83	503.1>427.1	503.1>457.1



同样品基质下验证了该方法的有效性。真菌毒素的定量限在 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 到 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。所有化合物的定量限都满足行业标准的要求。

参考文献

1. GB 2761-2017
2. EC 1881/2006
3. Amended regulation EC 1126/2007
4. Von Czapiewski, Kristin; Voller, Angela; Birgit Schlutt, et al. Simultaneous Analysis of 14 Mycotoxins and 163 Pesticides in Crude Extracts of Grain by LC-MS/MS, Tech note. Publication number: 2110210-01
5. Jose Diana Di Mavungu, Sofie Monbaliu, Marie-Louise Scippo: Food Additives and Contaminants 26(2009) 885-895.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8289-ZH-A



SWATH® 技术应用于国标 GB 2763-2016 中 210 种农药的筛查和定量分析

符合最新欧盟SANTE/11945/2015农残筛查标准要求，集筛查和二级定量于一体的解决方案

张元媛，贾彦波，靳文海

SCIEX，亚太应用支持中心（北京），中国

近年来，农药残留引起的安全问题已引起全社会的高度关注。2017年6月18日正式实施的《食品安全国家标准食品中最大农药残留限量》(GB2763-2016)中明确规定了一些农药的最大残留限量，是目前涵盖农药种类数目最多的限量标准。对多种农残同时筛查和定量分析成为实验室未来分析方法的趋势。

在以精确质量质谱进行农残筛查时，通常以保留时间和一级质量精度作为阳性判定依据，但对于复杂基质样品和同分异构体的判定，具有一定局限。

欧盟最新发布的“食品饲料中农残分析的质量控制和方法确认的指导文件(SANTE/11945/2015)”，对于精确质量质谱农残筛查作出如下规定：对于阳性样品的判别，不仅要求高质量精度的一级和二级质谱信息（ $< 5 \text{ ppm}$ ），还要求离子比率（ion ratio）偏差不得超过 $\pm 30\%$ 。

SWATH® (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra) 技术为SCIEX独有的高分辨质谱数据采集技术。

具有以下特点：

1. 一针进样，同时得到所有分析物全色谱峰的高



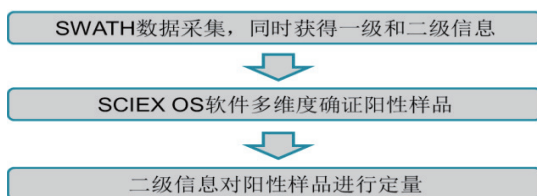
质量一级和二级质谱信息。

2. 农残筛查阳性结果的判定，不仅具备一级质量精度、保留时间、化合物同位素丰度、二级谱库匹配四重关卡，更可满足欧盟最新的ion ratio的法规要求，保证结果准确可靠。
3. 因为二级质谱信息是全色谱峰采集，所以二级碎片可同时用于定量分析，选择性更强，有效降低基质干扰，实现一针进样，定性定量同步完成，有效缩短实验周期。
4. 采集的二级质谱信息具有可溯源性，可根据日后需要随时调用关注的二级质谱信息，无需重复进样，节省人力物力。



实验思路

本实验选择GB2763-2016中210种农药残留建立SWATH®采集方法，一针进样获得高质量一级和二级质谱信息，通过质量精度、同位素丰度、保留时间、二级库匹配、ion ratio等五个维度进行阳性样品筛查，同时根据二级质谱信息对阳性化合物进行定量。一针进样，同时进行定性和定量分析，具体流程如下：



仪器设备

SCIEX ExionLCT™液相系统+ X500R Q-TOF质谱系统

SCIEX OS数据采集和处理软件



样品制备

果蔬样品采用国际通用的QuEChERS (AOAC 2007.1) 方法处理，净化液以水稀释 (v: v=1: 2)，取20 μL进样分析。

液相方法

- 流动相A: 水 (含5 mM 甲酸铵)
- 流动相B: 甲醇(含5 mM 甲酸铵) ；

色谱柱: Phenomenex Kinetex Biphenyl, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm。

质谱方法

SWATH®数据采集方式, ESI源正离子扫描, 一次进样同时采集TOF-MS和MS/MS数据。



实验结果

- 一次进样同时对210种农药进行筛查，每个农药都有固定的保留时间，在本方法条件下即使在无标准品情况下也可根据保留时间进行筛查。

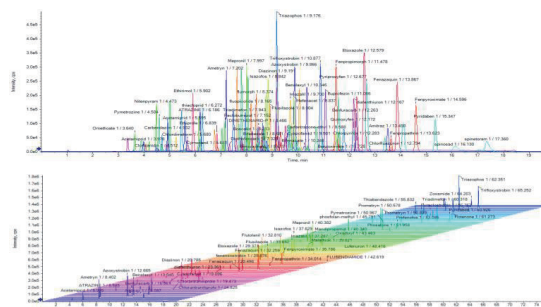


图1. 210种农药提取色谱图 (50 ppb)。

- 良好的仪器稳定性

X500R Q-TOF系统配备TOF恒温装置，具备稳定的质量准确性。连续进样，各化合物的一级质量偏差均小于2 ppm (图3)，保证结果准确可靠。



Component Name	Formula	Precursor Mass	Found At Mass	Mass Error Conf.	Mass Error (ppm)
Aldicarb 1	C5H10NS	116.053	116.0529	✓	0.1
Methamidophos 1	C2H8NO2PS	142.009	142.0086	✓	0.2
Methomyl 1	C5H10N2O2S	163.054	163.0534	✓	-1.4
Nicotine	C10H14N2	163.123	163.1230	✓	-0.2
Cyromazine 1	C6H10N6	167.104	167.1039	✓	-0.6
Acephate 1	C4H10NO3PS	184.019	184.0195	✓	1.8
Propamocarb 1	C9H20N2O2	189.160	189.1596	✓	-0.8
Tricyclazole 1	C9H7N3S	190.043	190.0432	✓	-0.6
Carbendazim 1	C9H9N3O2	192.077	192.0767	✓	-0.2
Chlordimeform 1	C10H13ClN2	197.084	197.0840	✓	-0.2
Cymoxanil 1	C7H10N4O3	199.083	199.0829	✓	1.9
Cymoxanil NA	C7H10N4O3	221.065	221.0645	✓	0.2
Cymoxanil 128	C4H5N3O2	128.045	128.0453	✓	-1.0
Pyrimethanil 1	C12H13N3	200.118	200.1181	✓	-0.8
Thiabendazole 1	C10H7N3S	202.043	202.0431	✓	-1.0
Simazine	C7H12ClN5	202.085	202.0856	✓	1.0
Carbaryl 1	C12H11NO2	202.086	202.0864	✓	0.6

图2. 韭菜加标样品中一级质量精度展示 (10 ppb)。

3. 一针进样，获得全面且高质量的一级和二级质谱信息

与IDA触发式采集符合判定条件的化合物的二级信息相比，SWATH®技术对化合物母离子的质量范围进行智能窗口划分，每个窗口内的所有离子一起碰碎，从而得到质量范围内所有离子的一级和二级质谱信息，进一步通过软件智能去卷积进行数据库匹配。如图3所示，在韭菜基质中添加200余种农残混标 (10 ppb)，在百治磷的出峰时间下因基质共流出物过多，IDA采集方法未获得百治磷的二级质谱信息。而SWATH®采集数据不仅获得了百治磷二级质谱信息，且和数据库标准品二级信息匹配良好。表明其在复杂基质中仍可获得高质量的二级质谱信息。

4. 符合最新欧盟SANTE/11945/2015农残筛查标准要求

欧盟发布的农残鉴定指导文件 (SANTE/11945/2015)，要求在使用高分辨质谱进行鉴定时，不仅要求提供高质量精度的一级和二级质谱信息 (< 5 ppm)，而且规定了两个离子的峰面积 ion ratio在样品和标准品中偏差不超过30%。

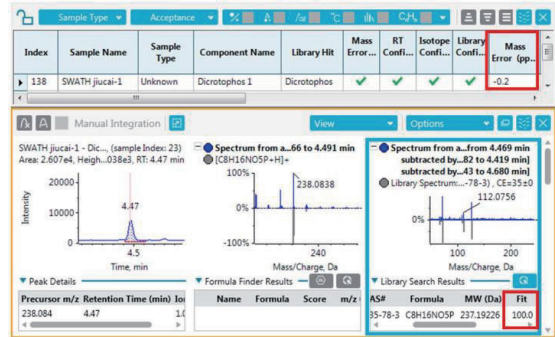
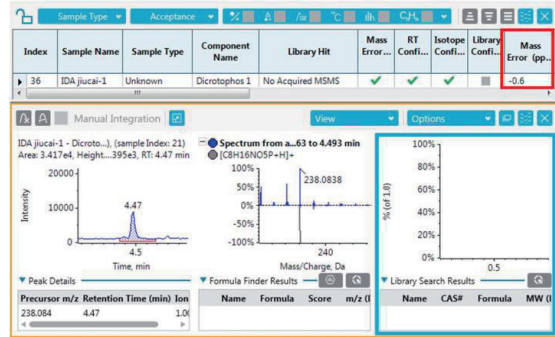


图3. 韭菜加标样品中百治磷二级信息展示 (10 ppb; 上: IDA; 下: SWATH®)。

Table 4. Identification requirements for different MS techniques²

MS detector / characteristics	Typical systems (examples)	Acquisition	Requirements for identification	
			minimum number of ions	other
Unit mass resolution	quadrupole, ion trap, TOF	full scan, limited m/z range, SIM	3 ions	
MS/MS	triple quadrupole, ion trap, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	selected or multiple reaction monitoring (SRM, MRM), mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 product ions	S/N ≥ 3 [¶] Analyte peaks in the extracted ion chromatograms must fully overlap.
Accurate mass measurement	High resolution MS: (Q)-TOF (Q)-Orbitrap FT/ICR-MS sector MS	full scan, limited m/z range, SIM, fragmentation with or without precursor-ion selection, or combinations thereof	2 ions with mass accuracy ≤ 5 ppm ^{¶¶¶}	Ion ratio within ±30% (relative) of average of calibration standards from same sequence
		combined single stage MS and MS/MS with mass resolution for precursor-ion isolation equal to or better than unit mass resolution	2 ions: 1 molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion with mass acc. ≤ 5 ppm ^{¶¶¶} plus 1 MS/MS product ion [¶]	

[¶] preferably including the molecular ion, (de)protonated molecule or adduct ion
^{¶¶} including at least one fragment ion
^{¶¶¶} < 1 mDa for m/z < 200
^{¶¶¶¶} no specific requirement for mass accuracy
^{¶¶¶¶¶} in case noise is absent, a signal should be present in at least 5 subsequent scans

图4. 欧盟文件(SANTE/11945/2015)中高分辨质谱筛查阳性判定依据。



运用SWATH®技术采集样品数据，在数据处理方法编辑界面可智能选择ion ratio限定范围。在结果的展示上以“交通灯”的方式对阳性结果进行判定，满足欧盟农残筛查的法规要求。

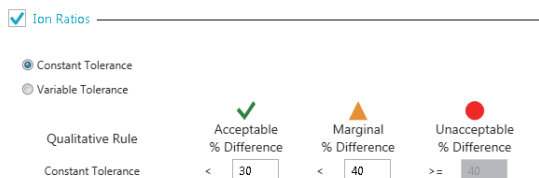


图5. SCIEX OS 软件方法编辑界面设定ion ratio范围。

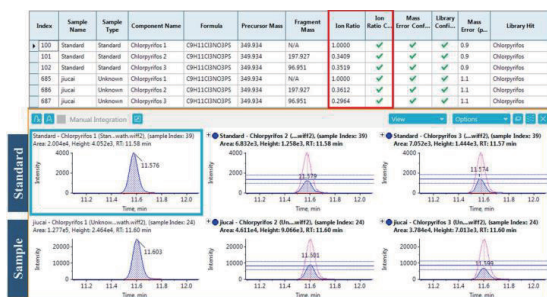


图6. SCIEX OS 软件结果列表中ion ratio结果展示。

5. 高选择性的二级质谱定量

SWATH®技术是全能谱峰采集二级信息，所以可以用采集到的高精度二级碎片进行定量分析，与一级定量相比选择性更好，有效降低基质干扰。如图7所示，在韭菜加标样品（1 ppb）中，啶虫脒一级提取色谱图背景信号较高，且在出峰位置存在一定基质干扰；而二级提取色谱图背景信号低，在出峰位置无干扰，保证低浓度点定量的准确。

以毒死蜱二级质谱信息做标准曲线，结果显示在0.02-200ng/mL 范围内，线性良好（ $r^2 > 0.99$ ），且标准曲线上各浓度点理论浓度与实际计算浓度的

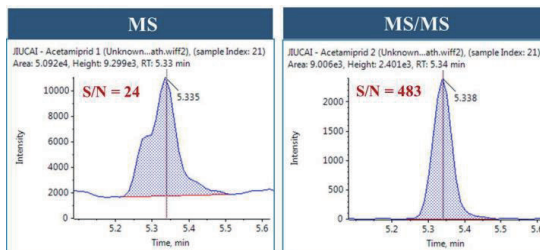


图7. SWATH®方法采集韭菜加标样品（1 ppb啶虫脒一级和二级提取色谱图）。

偏差值在85%-115%之间，保证不同浓度水平样品的准确定量。

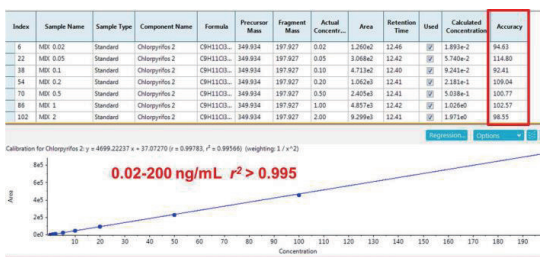


图8. 毒死蜱二级质谱信息定量标准曲线。

6. 可溯源式数据分析，无需再次采集数据

SWATH®技术采集样品数据，所有化合物的全部二级碎片都被采集并记录，具有可溯源性。无需重复进样，可根据需求随时调用关注信息，节省实验时间和成本。如图9所示，SWATH®采集数据，在葡萄加标样品（1 ppb）中，3-羟基克百威碎片通道（ m/z 181.0863）出峰较好，而该碎片通道在同浓度韭菜加标样品中，基质抑制现象明显，未见明显色谱峰。无需重复进样，在数据处理界面调用另一碎片通道（ m/z 163.0752），该通道受韭菜基质影响较小，可直接用于3-羟基克百威在韭菜基质中的定量及ion ratio判定，避免大量重复性操作，节省人力物力。

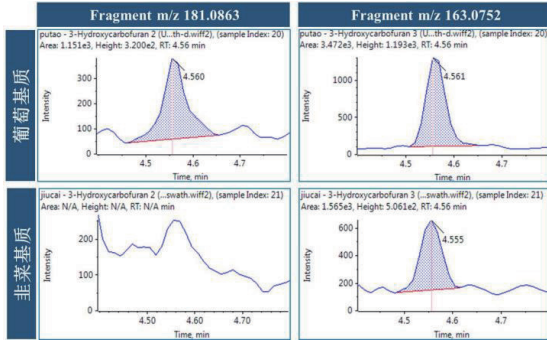


图9. SWATH®采集数据可溯源性展示。

7. SWATH®技术在实际果蔬样品中农残筛查的应用

分别采集1 韭菜、2 豇豆、3 葡萄、4 茶叶、5 生姜样品的SWATH®数据，一次性导入所有数据，使用SCIEX OS软件进行数据处理。根据“交通灯”信号，筛选阳性结果；同时选择特异性二级碎片，在定性筛查的同时进行二级定量。

在韭菜样品中筛选到多菌灵残留（图10），其一级质量精度，同位素丰度，保留时间和二级库匹配信号灯显示均为绿色，且与标准品对比，ion

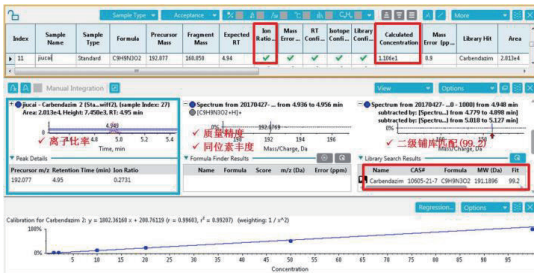


图10. 韭菜中多菌灵样品筛查及定量结果。

ratio在欧盟规定30%范围内，保证结果的可靠。同时，SCIEX OS软件可以直接在建立方法时实现定性和定量分析同步，通过指定特征碎片离子，即可得到二级定量结果。各样品中农药残留量见表1。

表1. 各样品中农药检出结果

	韭菜	豇豆	葡萄	生姜	茶叶
多菌灵	11.0			3.3	
毒死蜱	3.8				1.7
克百威	8.2		3.2		
氯虫苯甲酰胺		4.1			
灭蝇胺		37.3			
苯醚甲环唑		18.0			
乙螨唑		823.2			
甲氧菊酯		5.3			
三唑磷					
水胺硫磷			6.3	9.1	
咪鲜胺				5.2	
戊唑醇					2.8
实验结果					

本方法在X500R Q-TOF平台，以GB2763-2016中210种农残为例，建立SWATH®数据采集和数据处理方法，并应用于不同水果、蔬菜的农残检测中。该方法可满足欧盟SANTE/11945/2015农残筛查标准中关于ion ratio 的判定标准，同时以一级质量精度，保留时间，同位素丰度，二级信息数据库匹配多重卡确定阳性样品。一针进样，采集所有化合物的一级和二级质谱信息，并将二级信息用于定量分析，具有更高选择性，实现一针进样同时定性定量分析。有效缩短实验周期，节省实验成本。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-6922-ZH-A



SWATH[®] 技术应用于水果蔬菜中农残筛查的解决方案

SCIEX X500R 系统应用

孙晓靖, 程海燕, 李立军, 靳文海
SCIEX, 亚太应用支持中心(上海), 中国

引言

众所周知, 中国现代农业长期以来习惯性的大量使用化肥、农药、除草剂, 如此种植方式带来的结果一方面降低了食物中营养物质的含量, 另一方面各种化学药物的残留也给人类的健康带来损害, 经证实农药残留会干扰身体的内分泌影响免疫系统和造血系统, 甚至导致孕妇体内的胎儿内脏发育不全或畸形。比起多吃蔬菜和水果给人体带来的益处, 现在更让人们担心的是普遍存在的农药残留超标问题给人体带来的伤害。

随着液质联用技术的不断发展和普及, 越来越多的农残检测技术基于 LC-MS/MS 系统进行开发。应用于农残筛查最常见的如基于 QTRAP[®] 系统的 MRM-IDA-EPI 和基于高分辨系统的 TOF-IDA-MSMS 技术。而 SWATH (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra) 技术基于高分辨系统, 又综合了 IDA 和 MRM 的优势, 将母离子的质量范围分成多个质量窗口, 每个窗口内的所有离子一起碰撞碎裂, 从而得到整个质量范围内的所有离子的碎片信息。SWATH[®] 技术所测得到的二级碎片不同于 IDA 只测被选中触发的离子, 从而保证了所有离子碎片的连续性, 可以实现 MRM^{HR} 方式定量。通过独有的可变窗口设置, 能够根据离子量的多少智能分配质量窗口的大小, 保证采集到高质量的数据。

SCIEX 高分辨质谱 X500R QTOF 系统能够在高扫描速度下同时保持高分辨率、高准确度、高灵敏



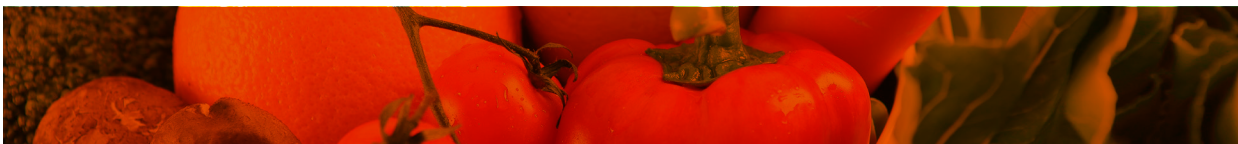
度和高线性范围, 因此 SCIEX SWATH[®] 技术不仅在蛋白大分子领域被广泛应用, 并且在农残筛查等小分子领域也发挥着重要作用。X500R QTOF 系统使用了全新设计的 OS 软件, 实现了仪器控制、数据采集、数据处理集于一体的全流程分析。软件中内置了 SWATH[®] 方法的设置和强大的自动去卷积能力, 简便快捷的设计满足了食品安全领域的用户需求。

实验思路:

1. 收集处理蔬菜水果样品, 测实际样品的 SWATH[®] 数据
2. 配制标准曲线, 测试 190 农残标准品 SWATH[®] 数据
3. 蔬菜水果样品中的农残筛查
4. MRM^{HR} 对筛查结果定量

样品处理:

- 称取 10 g 打碎的样品于 50 mL 离心管



- 加入10 mL含1%乙酸的乙腈，震荡1 min
- 加入1.5 g NaAC，6 g MgSO₄，震荡，离心
- 转移上清液8 mL，加入Agela净化包
- 离心5 min，取上清液上机分析

前处理采用 QuEChERS 方法，分别得到样品 1 韭菜、2 菜花、3 菜豆、4 清洗过的冬枣、5 未清洗冬枣、6 香梨。

色谱方法：

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18，100×3.0 mm，2.6 μm；

流动相：A：含 5 mM 乙酸铵水
B：含 5 mM 乙酸铵甲醇
梯度洗脱

流速：0.4 mL/min；

柱温：40℃；

进样量：10 μL

质谱方法：

Time (min)	B%
0	3
1	3
2	45
19	95
22	95
22.1	5
25	5

扫描方式：SWATH®采集方式

离子源：ESI+源

CDS 自动校正

表 1. 离子源参数

IS 电压: 5500V	气帘气 CUR: 35psi
雾化气 GS1: 55 psi	辅助气 GS2: 55 psi
源温度 TEM: 550oC	碰撞气 CAD: 7
碰撞能量 CE ± CES: 35 ± 15V	

数据采集和 SWATH® 设置流程

IDA (Information Dependent Acquisition) 是通过 TOFMS Survy Scan 先做预扫描，当检测到出峰离子触发成功，扫描方式切换为 Q1 选择母离子，采集该目标离子的高灵敏度的 MS/MS 二级质谱图。SWATH® (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra) 则是将所有离子分配到连续的窗口内，每个窗口内的所有离子一起传输到碰撞室打碎成 MS/MS 二级碎片，通过软件强大的去卷积功能将碎片归属到对应母离子，通过该技术得到所有丰度离子的二级碎片，保证了低含量的目标物的二级信息不被遗漏，能够更加完整和准确的实现痕量残留的筛查工作。

独有的智能可变窗口 (Variable Windows)，根据样品中离子的分布，在分布密集的区域设置窄的窗口，在离子较少的区域设置宽的窗口，保证所有离子采集到高质量的二级质谱图。



图 1. 左 IDA 示意图；右 SWATH® 示意图。



质谱方法内置 SWATH 选项

Experiment: SWATH

Priority: Precedence Spray voltage: 5500 V

TOF MS

TOF start mass: 100 Da Declustered potential: 80 V Collision energy: 53 V

TOF stop mass: 630 Da DP spread: 0 V CE spread: 0 V

Accumulation time: 0.2 s

Advanced Experiment Settings

Time bins to sum: 14 Channel 2: Channel 4: Channel 7:

TOF MS/MS

TOF start mass: 50 Da TOF stop mass: 630 Da Dynamic collision energy:

Accumulation time: 0.05 s Charge state: 1

Mass Table: Split MS/MS windows

Q1 Window

Precurser ion start mass (Da)	Precurser ion stop mass (Da)	Declustered potential (V)	DP spread (V)	Collision energy (V)	CE spread (V)	Time bins to sum
1 99.5000	159.5000	80	0	35	15	4
2 158.5000	202.0000	80	0	35	15	4
3 202.0000	229.5000	80	0	35	15	4
4 228.3000	252.0000	80	0	35	15	4

图 2. SWATH®方法设置

SCIEX OS 软件中 Experiment 选择 SWATH®采集方式，软件自动列出 SWATH®方式需要设置的参数，Mass Table为 Q1 窗口。

通过 Variable Window Calculator 可变窗口计算器，可以根据 TOFMS 的一级母离子自动计算出 SWATH®的智能可变窗口，复制粘贴到 Mass Table 即可建立方法，方法建立 简便快捷，易于操作。

Index	Mass Charge (Da)	Area	
1	102	101.090	18.638
2	59	102.126	13.149
3	739	114.2912	6.051
4	844	119.0802	11.2520
5	1591	131.1588	7.0689
6	2177	145.1567	7.8922
7	2533	148.1141	2.2976
8	2573	149.2232	128.819
9	2198	150.0289	13.1971
10	2163	151.1586	33.9723
11	2147	151.5952	113.154
12	2102	154.1251	7.9285
13	2138	153.1290	16.2485

图3. TOFMS 的一级母离子

SWATH Variable Window Assay Controls

Target number of windows: 10 (Default # may be less depending on min window width setting)

Lower m/z limit: 100 (min 2000)

Upper m/z limit: 630 (max 1250 for TripleTOF 5600, max 2250 for TripleTOF 6000)

Round bin edges to x figures: 1 (1 figure post decimal recommended)

Window overlap (Da): 1.0 (1 Da overlap recommended)

Minimum window width (Da): 3

CEs: 15

99.5	149.1	15
148.1	170	15
169	203	15
202	221.6	15
220.6	236.4	15
235.4	252.2	15
251.2	273.8	15
272.8	293.6	15
292.6	306.6	15
305.6	318.8	15
317.8	331.3	15
330.3	345.6	15
344.6	364.4	15
363.4	413.8	15
412.8	610.5	15

Q1 Window

图4. Variable Window Calculator

TOF MS/MS

TOF start mass: 50 Da TOF stop mass: 630 Da Dynamic collision energy:

Accumulation time: 0.05 s Charge state: 1

Mass Table: Split MS/MS windows

复制粘贴到 Mass Table

Precurser ion start mass (Da)	Precurser ion stop mass (Da)	Declustered potential (V)	DP spread (V)	Collision energy (V)	CE spread (V)	Time bins to sum	Channel 1	Channel 2	Channel 4
1 99.5000	159.5000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2 158.5000	202.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
3 202.0000	229.5000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
4 228.3000	252.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
5 252.0000	280.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
6 285.0000	304.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
7 305.0000	324.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
8 323.0000	341.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
9 344.0000	364.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
10 363.0000	413.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
11 412.0000	610.0000	80	0	35	15	4	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

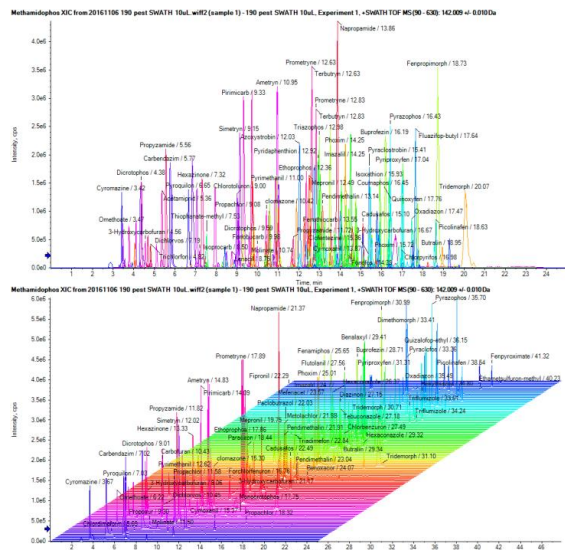


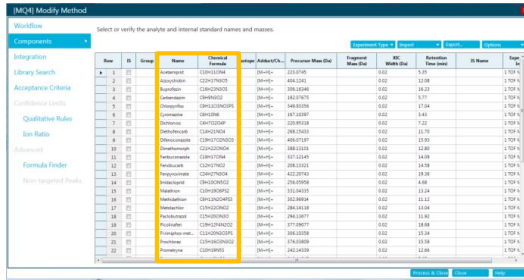
图5. SWATH®采集190种农残标准品色谱图

数据分析

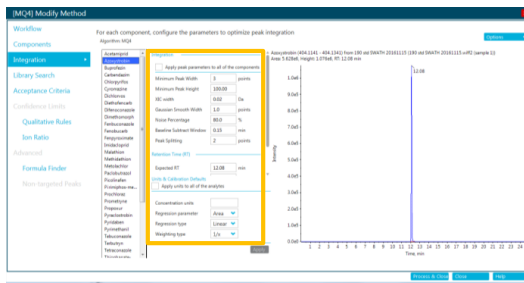
一、定性筛查

分别测定样品 1 韭菜、2 菜花、3 菜豆、4 清洗过的冬枣、5未清洗冬枣、6 香梨的 SWATH®数据，使用 X500R OS 软件进行数据处理，通过质量精度、保留时间、同位素分布和二级库匹配四大置信条件，筛查 6 个样品中的农药残留。

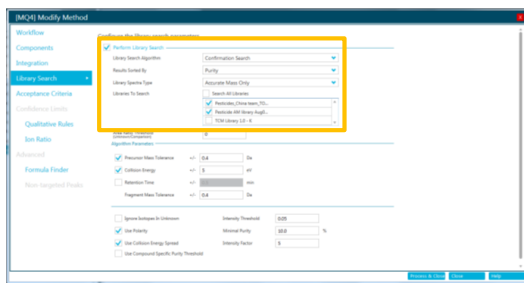
1、选择标准品数据建立筛查方法—导入筛查列表



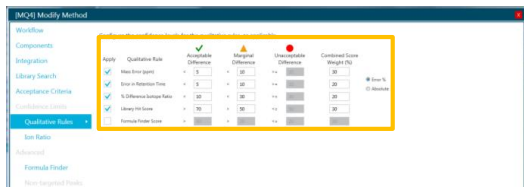
2、设置定量积分参数



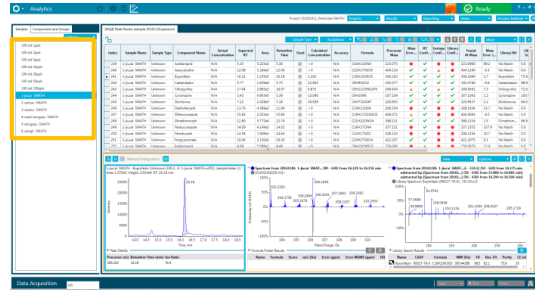
3、设置库搜索条件



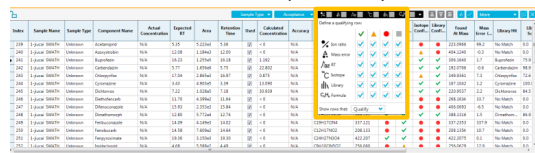
4、设置筛查置信条件



5、一次性导入所有标准品和样品的 SWATH®数据进行筛查



6、通过 Mass error、RT、Isotope、Library 过滤结果



7、得到每个样品的筛查结果

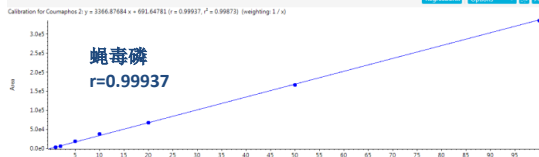


二、MRM^{HR} 二级定量

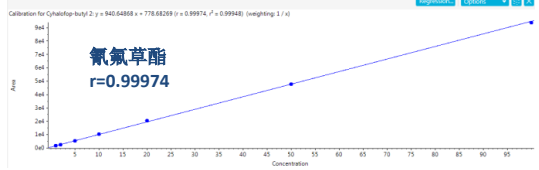
在复杂基质样品中使用 TOFMS 一级数据定量有基线噪音高，线性范围窄等缺点，X500R QTOF 系统的 OS 软件可以直接在建立定量方法时复制粘化化合物的离子对，通过 MRM^{HR} 方式处理 SWATH®数据，得到二级定量结果。



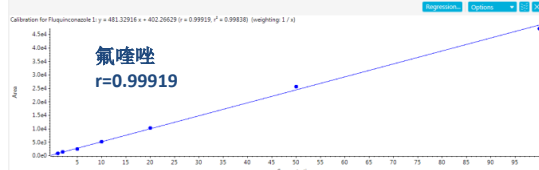
Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Preconor Man	Fragment Man	Actual Concentration	Expected RT	Area	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
300	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	1.00	13.35	3.676e3	13.11	☑	0.888	88.63
670	190 ml 2ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	2.00	13.35	6.905e3	13.34	☑	1.845	92.27
1040	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	5.00	13.35	1.820e4	13.34	☑	5.514	110.29
1410	190 ml 10ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	10.00	13.35	3.706e4	13.33	☑	11.068	110.68
1780	190 ml 20ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	20.00	13.35	8.614e4	13.36	☑	20.032	100.58
2150	190 ml 50ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	50.00	13.35	1.668e5	13.36	☑	49.324	98.65
2520	190 ml 100ppb SWATH	Standard	Coumaphos 2	362.900	307.000	100.00	13.35	3.351e5	13.34	☑	99.320	99.33



Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Preconor Man	Fragment Man	Actual Concentration	Expected RT	Area	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
320	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	1.00	17.10	1.653e3	17.07	☑	0.927	82.75
688	190 ml 2ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	2.00	17.10	2.689e3	17.10	☑	2.030	101.52
1058	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	5.00	17.10	5.446e3	17.09	☑	4.961	99.23
1428	190 ml 10ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	10.00	17.10	1.042e4	17.10	☑	10.702	103.02
1798	190 ml 20ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	20.00	17.10	2.054e4	17.11	☑	21.086	105.43
2168	190 ml 50ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	50.00	17.10	4.794e4	17.11	☑	49.817	99.63
2538	190 ml 100ppb SWATH	Standard	Cyhalothrin butyl 2	375.100	120.000	100.00	17.10	9.389e4	17.09	☑	99.927	99.93



Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Preconor Man	Fragment Man	Actual Concentration	Expected RT	Area	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
328	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	1.00	17.51	8.904e2	17.50	☑	0.104	101.42
696	190 ml 2ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	2.00	17.51	1.348e3	17.51	☑	0.206	103.20
1066	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	5.00	17.51	2.609e3	17.51	☑	4.985	91.70
1436	190 ml 10ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	10.00	17.51	5.211e3	17.51	☑	10.189	101.89
1806	190 ml 20ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	20.00	17.51	1.029e4	17.51	☑	20.453	102.26
2176	190 ml 50ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	50.00	17.51	2.571e4	17.54	☑	51.965	103.17
2546	190 ml 100ppb SWATH	Standard	Fluquinconazole 1	378.000	307.100	100.00	17.51	4.717e4	17.51	☑	97.158	97.16



Index	Sample Name	Sample Type	Component Name	Preconor Man	Fragment Man	Actual Concentration	Expected RT	Area	Retention Time	Used	Calculated Concentration	Accuracy
302	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	1.00	13.35	2.688e3	13.32	☑	0.929	92.87
676	190 ml 2ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	2.00	13.35	4.376e3	13.35	☑	1.854	92.70
1042	190 ml 5ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	5.00	13.35	1.251e4	13.34	☑	5.130	106.59
1412	190 ml 10ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	10.00	13.35	2.452e4	13.33	☑	10.708	107.08
1782	190 ml 20ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	20.00	13.35	4.714e4	13.36	☑	20.842	104.21
2152	190 ml 50ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	50.00	13.35	1.043e5	13.36	☑	48.214	96.41
2522	190 ml 100ppb SWATH	Standard	Pyridaben 1	365.000	309.000	100.00	13.35	2.041e5	13.34	☑	100.124	100.12

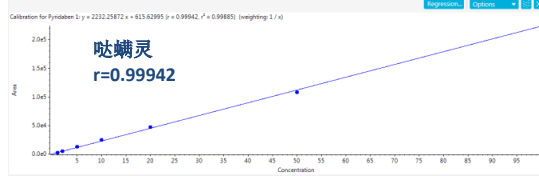


图 6. 定量线性，以蝇毒磷、氰氟草酯、氟啶唑、吡啶灵为例

配制 190 中农药标准曲线 1ng/mL~100ng/mL，建立 MRM^{HR} 定量方法，得到的二级定量线性，如图 6。

通过高灵敏度高选择性的 MRM^{HR} 方式，对韭菜、菜花、菜豆、洗过的冬枣、未洗的冬枣、香梨样品中含有的农残进行定量，得到以上样品中含有的农药残留量见下表。

韭菜样品中含有的农残量 (ng/mL)

Sample Name	Sample Type	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Library Hit	Calculated Concentration
1-juica SWATH	Unknown	Carbendazim	5.79	7.427e5	5.75	Carbendazim	8.69
1-juica SWATH	Unknown	Cyromazine	3.46	1.084e4	3.39	Cyromazine	4.53
1-juica SWATH	Unknown	Prometryne	12.68	1.022e5	12.62	Prometryn	3.52
1-juica SWATH	Unknown	Propoxur	7.08	8.171e4	7.04	Propoxur	33.89
1-juica SWATH	Unknown	Pyrimethanil	11.02	1.644e4	10.99	Pyrimethanil	23.36
1-juica SWATH	Unknown	Thiophanate-methyl	7.53	3.481e4	7.53	Thiophanate-methyl	2.07

菜花样品中含有的农残量 (ng/mL)

Sample Name	Sample Type	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Library Hit	Calculated Concentration
2-caihua SWATH	Unknown	Imidacloprid	4.67	4.973e3	4.63	Imidacloprid	1.24
2-caihua SWATH	Unknown	Propoxur	7.08	1.218e5	7.00	Propoxur	58.08
2-caihua SWATH	Unknown	Tebuconazole	14.45	1.429e4	14.38	Tebuconazole	1.05

菜豆样品中含有的农残量 (ng/mL)

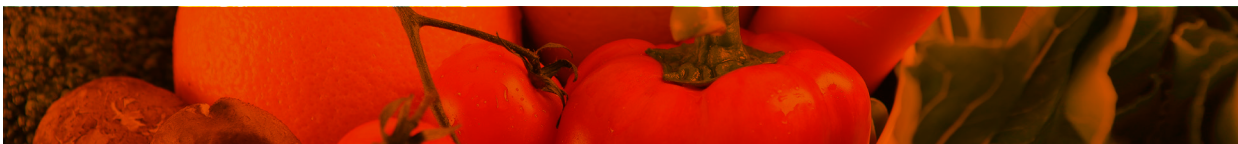
Sample Name	Sample Type	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Library Hit	Calculated Concentration
3-caidou SWATH	Unknown	Acetamiprid	5.37	5.843e4	5.34	Acetamiprid	3.66
3-caidou SWATH	Unknown	Azoxystrobin	12.86	4.469e5	12.81	Azoxystrobin	8.24
3-caidou SWATH	Unknown	Carbendazim	5.79	1.022e5	5.75	Carbendazim	1.83
3-caidou SWATH	Unknown	Propoxur	7.08	3.681e4	7.03	Propoxur	13.67
3-caidou SWATH	Unknown	Pyraclotrobin	15.47	2.327e5	15.40	Pyraclotrobin	35.14
3-caidou SWATH	Unknown	Pyrimethanil	11.02	1.875e5	10.96	Pyrimethanil	268.81
3-caidou SWATH	Unknown	Tebuconazole	14.45	4.923e4	14.40	Tebuconazole	4.48

洗过的冬枣样品中含有的农残量 (ng/mL)

Sample Name	Sample Type	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Library Hit	Calculated Concentration
4-wash dongzao...	Unknown	Azoxystrobin	12.86	7.829e5	12.84	Azoxystrobin	14.56
4-wash dongzao...	Unknown	Pyraclotrobin	15.47	1.217e5	15.41	Pyraclotrobin	18.13

未洗的冬枣样品中含有的农残量 (ng/mL)

Sample Name	Sample Type	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Library Hit	Calculated Concentration
5-dongzao SWATH	Unknown	Acetamiprid	5.37	7.937e4	5.34	Acetamiprid	5.11
5-dongzao SWATH	Unknown	Azoxystrobin	12.86	1.201e6	12.83	Azoxystrobin	22.41
5-dongzao SWATH	Unknown	Buprofezin	16.23	4.155e5	16.19	Buprofezin	159.84
5-dongzao SWATH	Unknown	Carbendazim	5.79	1.368e5	5.75	Carbendazim	1.43
5-dongzao SWATH	Unknown	Fenpropiimate	19.36	2.687e5	19.29	Fenpropiimate	68.70
5-dongzao SWATH	Unknown	Imidacloprid	4.67	1.982e6	4.64	Imidacloprid	588.29
5-dongzao SWATH	Unknown	Paclitrazol	11.94	2.839e6	11.88	Paclitrazol	139.82
5-dongzao SWATH	Unknown	Pyraclotrobin	15.47	4.837e5	15.41	Pyraclotrobin	73.59
5-dongzao SWATH	Unknown	Triadimefon	12.86	6.106e4	12.82	Triadimefon	23.32



雪梨样品中含有的农残量 (ng/mL)

Sample Name	Sample Type	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Library Hit	Calculated Concentration
6-uangli SWATH	Unknown	Acetamiprid	5.37	1.229e6	5.25	Acetamiprid	65.54
6-uangli SWATH	Unknown	Imidacloprid	4.67	1.245e4	4.68	Imidacloprid	3.43
6-uangli SWATH	Unknown	Tebuconazole	14.45	3.777e4	14.43	Tebuconazole	3.35

总结

SCIEX X500R 的 SWATH® 技术，能够一次进样得到所有离子的一级和二级数据，完整的二级谱图能够对每一个离子进行搜库鉴定，即使样品中的被测物含量低也依然能够得到二级谱图，通过高分辨率质谱的质量精确度、同位素分布、保留时间和二级库匹配四大置信条件进行定性确证。

SWATH® 数据二级谱图中任何一个子离子的连续色谱峰也可以做为定量数据分析的依据，在一级色谱图有干扰峰的情况下，MRM^{HR} 方式的二级定量能够有效的降低背景噪音，排除干扰离子，使定量结果更加准确可靠。

SWATH® 方法建立过程非常简便，在 SCIEX OS 软件中的内置 SWATH® 选项直接建立方法，并且通过可变窗口 (Variable Windows) 设置可以将离子进行智能的划分窗口，保证每个离子都能够得到高质量的数据，满足数据处理的需要。

本实验主要测试了 SWATH® 技术在农残检测领域的应用，一次 SWATH® 数据采集同时完成了 IDA 和 MRM^{HR} 两种采集方式所得到的数据，实现了 QTOF 仪器上定性和定量数据采集方式的结合。



一种稳定且灵敏的非生化方法直接分析食品和环境样品中的极性农药

Wim Broer¹, Ugo Chiuminato², Jianru Stahl-Zeng², Daniel McMillan³ and Phil Taylor³

¹. Nofalab Laboratories, Schiedam, NL; ². SCIEX, Darmstadt, DE; ³. SCIEX, Warrington, UK

极性农药测定的挑战

多年来，用于食品和环境样品中农药定量的多残留LC-MS/MS分析方法的普及率稳步上升，现在被认为是这些领域大多数实验室的最低要求配置。现在串联四极杆能够检测到极低水平这些法规规定的化合物，且只需极少的样品制备，例如QuEChERS，从而使实验室能够快速循环往复地处理大量含有许多分析物的样品。然而，一些极性很强的化合物并不适合这种提取方法、色谱法或电离效果很差，需要开发建立单个残留物方法，这些方法涉及费时的制备和分离，并且常常涉及衍生化以改善检测。

主要优势

所有分析物都得到了很好的保留，也可以检测到主要可能会造成干扰的背景成分。分析物之间的分离也足以保证准确的鉴定，并且保留时间是可再现的。环境水中加标的灵敏度与标准中的一致，并且实际的饮用水样也可以轻松实现20 ng/L目标物的检测限。在用于食品样品提取物的Nofalab方法和用于直接进水的改进方法中，基质效应被大大消除。应用QTRAP[®]的全扫描MS/MS可对阳性结果进行确证，未来的工作中将会研究不同的或另外的样品处理方法。

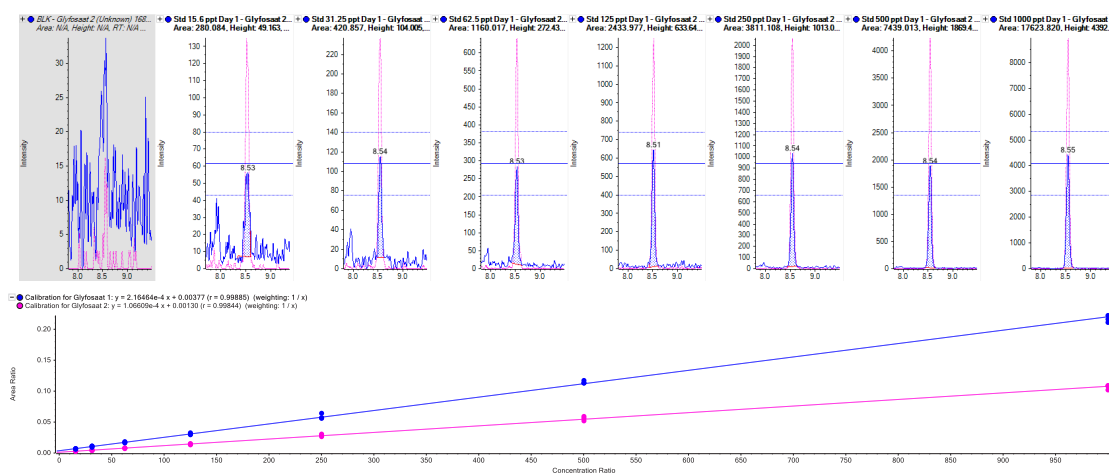


图1. 测定草甘膦的方法灵敏度和线性。使用改进的水样前处理方法，线性范围：15.6~1000 ng/L。离子对比率均在指定的±20%偏差范围内。

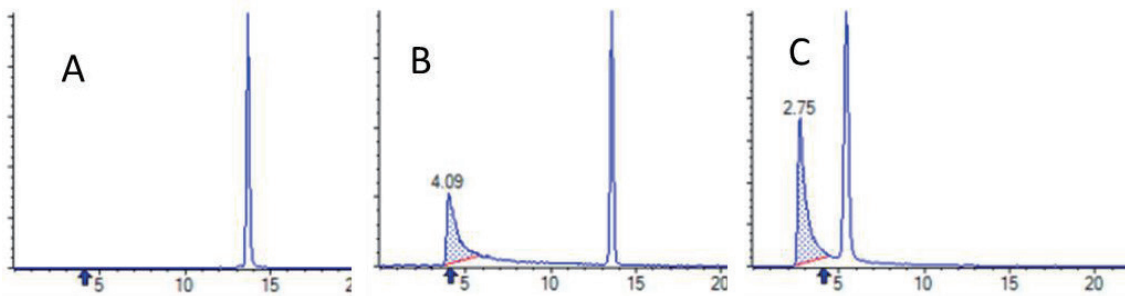


图2. Hypercarb色谱柱的使用：安装，基质样品进样活化/填充，重复进样，最后替换。图A显示了安装后Hypercarb色谱柱后进样分析的性能，没有草甘膦峰出现。图B显示用相同的色谱柱，进样30个菠菜提取物填充活化后，可以在4.09分钟检测到草甘膦峰。图C显示同样的色谱柱，100次进样后草甘膦峰在同一柱上的保留时间（RT）漂移。

日益关注的问题

最近随着公众越来越关注草甘膦的存在，这大大增加了对食品、饲料和环境中的草甘膦及其代谢物分析的需求，因此加速了更有效和更稳定的草甘膦分析方法的需求。提取和色谱方法在EURL-QUPPE方法中有详细描述，但实际上分离不稳定，因此强烈需要系统和方法维护。几种不同的基于HPLC或HILIC的方法未能解决重现性和灵敏度的问题，因此分析前的FMOC衍生化仍用于草甘膦，AMPA和草铵膦。虽然可以自动化，但这个过程仍然费时且昂贵，并且不适用于其他极性的农药。

开发一种高通量方法

NofaLab是一家独立的取样和测试实验室，位于荷兰鹿特丹附近，专门从事食品、饲料和环境安全等领域的工作。提供快速、定量分析方法的压力越来越大，使得NofaLab增加了LC-MS/MS仪器平台，并开发出一种新的方法，在单次分析中尽可能多地覆盖这些极性农药。已被证明离子色谱对分离是有益的，但是需要抑制剂，这不利于MS分析，并且需要改变入口系统，对于主要使用反相LC的质谱

仪，检测任务重且繁忙的实验室并不适用。因此，这里介绍的最终方法使用IC色谱柱，通过方法转化到反相系统并适用于MS，流动相的pH 9左右。

该方法可很好的进行草甘膦分析，对其他分析物和基质干扰具有良好的保留和分离性。方法满足DG-SATET要求的重现性（<20%）和回收率（80-110%），方法的LOD低于0.01 mg/kg。通过对QUPPE方法提取食品样本的分析，验证了该方法的优异的长期稳定性和耐用性。

当环境样品需要测试时，要就的检测限更低，在传统保留时间短的情况下，基质干扰更大，通常衍生化是唯一的选择。然而，由于草甘膦在这一新方法中得到了很好的保留，该实验室与SCIEX合作，进一步开发了此方法用于直接大体积进样。通过改变梯度条件和优化进样参数，已经开发出针对环境水样的第二种方法。尽管大体积进样（LVI）更容易受到pH变化的影响（例如，由于流动相的蒸发），但耐用性已被证明同样良好，并且在检测相同的分析物中，其LOD < 0.02 ng/L。



实验思路

食品样品

利用Anastassiades等人开发的QuPpe方法从植物和动物来源的样品中提取极性农药，该方法在CVUA Stuttgart²的中有很好的描述，并经过了几次修改。由于分析物是水溶性的，因此基于水萃取，添加甲醇和甲酸以提高效率。

添加内标对于大多数色谱方法中的保留时间变化的补偿至关重要，并有助于应对基质效应。这对于色谱性能变差，MS源变脏，快速失去灵敏度的谷物和种子样品尤其重要，因此在使用SPE过滤器的两种吸附剂的推进方法之前，尝试了QuPpe-AO3方法中描述的分散C18净化。

研究了各种色谱方法后，发现了它们具有的一些局限性。图2显示了分析前广泛调节的常见做法，在相对较少（通常为30-50）的样品进样后，为了保持峰形和保留时间，离子色谱方法显示出最大的优势，但洗脱液与电喷雾电离源的不相容性使其需要使用抑制剂，这对峰宽不利。然而，通过使用具有季铵基团的聚乙烯醇基柱并在通过非常灵敏的四极杆质谱仪检测之前使用碳酸氢铵缓冲液，消除了对抑制剂的需要。

表1. 用于方法验证的食品基质清单

经过验证的商品清单

A	水果和蔬菜
B	种子
C	植物油、脂肪和脂肪酸
D	谷物
E	草药和香料
F	肉类和海鲜食品
G	动物油、脂肪和脂肪酸
H	鸡蛋和鸡蛋产品
I	牛奶和牛奶食品
V	脂肪酸

对各种食品基质（表1）进行方法验证，所有食品基质均经过如上所述的处理。在0 μL进样，性能稳定、重现性好，但在200个样品后，峰值形状开始恶化，第350针入时峰出现明显变形，这是由于2 mm I.D柱容量有限。最终的色谱方法使用150 × 4 mm色谱柱，并使用相同材料的保护柱和0.5 μm过滤膜，每250个样品更换一次，以保持性能并保持MS源清洁。

水样

环境和饮用水样品所包含的颗粒物变化很大，这给进入LC造成困难，并且不利于重现性。然而，在高通量实验室情况下，需要最少的样品制备，SPE前处理显著增加时间和财政成本。为了克服这些挑战，当将样品转移到LC小瓶时，使用17 mm注射过滤器的Chromacol 17-SF-02（RC）进行简单的过滤步骤。将最终浓度为1 ppb的内标物添加到样品和标准品中，并以类似方式制备自来水中的QC样品。使用标准添加样品进行实验以研究任何潜在的基质效应。

使用岛津Nexera UHPLC分离，该系统包括LC-30AD泵、装有500 μL定量环的SIL-30AC自动进样器和CTO-20A柱温箱。采用类似于食品样品的色谱方法，采用500 μL大体积进样。在验证该方法时，主要重点是实现稳定的峰形状和所有分析物的保留时间。采用类似于食品样品的色谱方法，采用500 μL大体积进样。在验证该方法时，主要重点是实现稳定的峰形状和所有分析物的保留时间。进样环的大小（不考虑进样体积），初始条件，梯度和流动相的pH值具有非常显著的影响，因此应该确定最终的优化方法，并定期制备新的流动相。

方法采用实际饮用水样品进行验证，对AMPA和草甘膦的测试均可以达到20 ng/L的LOQ。

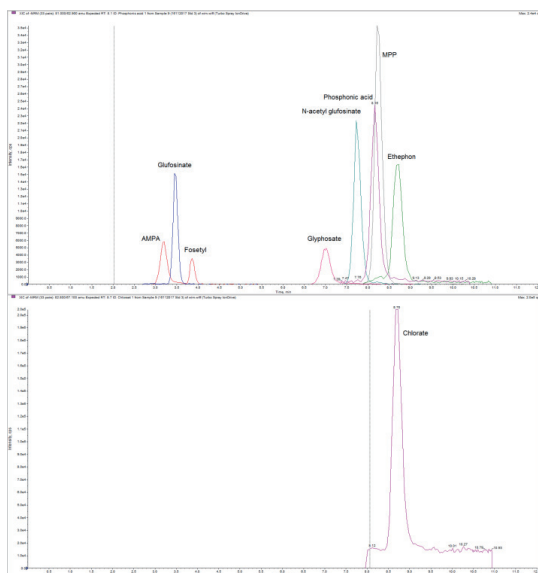


图3. 极性农药的色谱图示例。使用hypercarb柱的色谱分离是所述方法的一部分。

表2. SCIEX QTRAP® 6500+系统的源参数。

源参数

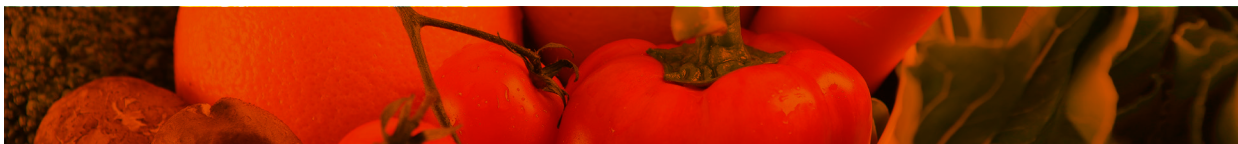
Curtain Gas (CUR)	30 psi
Collision Gas (CAD)	9 psi
IonSpray Voltage (IS)	-3000v
Temperature (TEM)	500 °C
Ion Source Gas (GS1)	55 psi
Ion Source Gas (GS2)	65 psi

MS-MS 分析

使用SCIEX QTRAP® 6500+质谱仪，电喷雾电离，负离子模式进行分析。针对表3中所述的每种分析物优化至少两个MRM离子对，以定量和确证它们在所有样品中的浓度。使用Analyst® 1.6.3采集数据，并使用MultiQuant™ 3.0.2软件参照内部标准进行定量和确证。

表3. 分析物的MRM离子对列表。内标对此方法至关重要，必须使用。

分析物	Q1 m/z	Q3 m/z
Glyphosate 1	167.9	150.0
Glyphosate 2	167.9	78.8
Glyphosate 3	167.9	62.8
Ethephon 1	142.9	106.8
Ethephon 2	142.9	79.0
N-ac Glufosinate 1	222.0	136.0
N-ac Glufosinate 2	222.0	62.8
N-ac Glufosinate 3	222.0	59.1
AMPA 1	110.0	81.2
AMPA 2	110.0	79.1
AMPA 3	110.0	62.9
Glufosinate 1	180.0	136.0
Glufosinate 2	180.0	95.0
Glufosinate 3	180.0	85.0
Glufosinate 4	180.0	63.1
3-MPPA 1	151.0	132.9
3-MPPA 2	151.0	107.0
3-MPPA 3	151.0	63.1
Phosphonic Acid 1	81.0	62.9
Phosphonic Acid 2	81.0	79.0



结果和讨论

食物样品

用NofaLab方法提取食品样品中的QuPPE处理的提取物和改进的水样，实现了分析物与基质干扰之间的良好分离，并且在峰形和保留时间方面具有优异的重复性。这些化合物在食品样品中的最大残留限量范围为10至2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，具体取决于商品和化合物⁴，不同的样品和化合物标准是不一样的。尽管水法规仍在讨论中，但预期今后的法规规定，环境样品的检测限为20 ng/L 。基质中一些分析物被证明和检测很困难，但是在方法验证中，对所有样品都很容易达到这些目标浓度。在没有系统维护的情况下，在NofaLab对来自各种商品的1000多个食品样品进行了分析，发现在保留时间、峰宽、峰面积和拖尾因子方面的稳定性极好。图1显示了基于草甘膦内标的几种重现性测定结果。

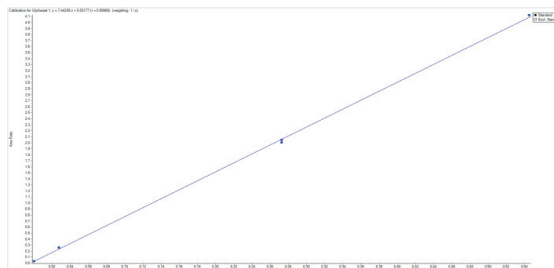


图4. 草甘膦校准标准。对于具有 $1/x$ 加权的草甘膦的线性回归，显示 r 值为0.9997，且重复性很好。

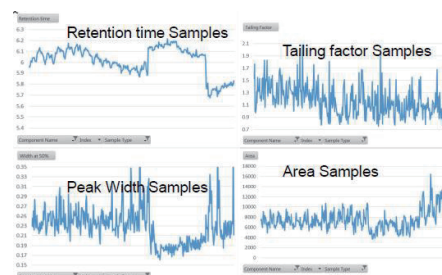


图5. 草甘膦内标的重现性数据。用于食品样品的NofaLab方法，测试了超过1000次注射水果/蔬菜，种子，蔬菜油/脂肪，谷物，草药/香料，肉/鱼，动物油/脂肪，蛋/蛋制品，牛奶/奶制品和其他脂肪酸提取物。

表4. 用NofaLab方法处理测定的各种食品基质中的检出限，以及EU标准中相应的最大残留限量 (MRL)¹。

产品	草铵膦总和			乙膦酸总和			草甘膦			氯酸盐			乙烯磷		
	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL	LOD	MRL	%RSD at MRL
水果和蔬菜	16	30	11%	25	2000	13%	5	100	15%	8	10	15%	18	50	11%
种子	12	30	12%	90	2000	15%	8	100	15%	3	10	10%	6	50	14%
植物油、脂肪和脂肪酸	15	30	19%	40	2000	12%	7	100	22%	2	10	6%	3	50	7%
谷物	18	30	12%	71	2000	14%	8	100	7%	7	10	14%	9	50	6%
药草和香料	25	100	8%	87	2000	13%	23	100	6%	8	10	15%	8	100	16%
肉和海产品	19	30	15%	23	100	12%	9	50	23%	4	10	8%	4	50	10%
动物油、脂肪和脂肪酸	14	30	20%	51	100	11%	9	50	25%	10	10	16%	7	50	12%
鸡蛋和鸡蛋产品	18	30	12%	33	100	11%	4	50	13%	12	10	9%	6	50	17%
牛奶和奶制品	17	30	9%	20	100	6%	8	50	22%	5	10	12%	5	50	13%
脂肪酸	21	100	14%	70	1000	14%	3	100	18%	4	10	9%	3	100	10%



水样

为了达到环境水样要求的灵敏度，需要增加样品的量，因此进行了增大进样体积和使用不同的定量环。随着每次增量变化，环路中洗脱液的组成发生变化，从而改变分析的初始条件以及分析物的保留时间和峰形。为了补偿，需要修改流动相的组成，最终开发出来的参数，发现该方法与用于食品样品的NofaLab方法一样稳定和耐用。所有分析物都得到很好的保留，允许在大多数其他干扰的背景成分洗脱后进行检测。分析物之间的分离也足以准确的鉴定，并且保留时间重复性好。发现加标环境水中的敏感性与标准中的相似，并且使用真实的饮用水样本可以轻松实现20 ng/L的目标检测限。为了验证结果，还进行了目标化合物的标准添加分析。

食品样品提取物的NofaLab方法和水样直接进样的改进方法都大大消除了基质效应。然而，在一些非常复杂的基质中，MRM离子比被发现超出正常偏差的 $\pm 20\%$ 。使用QTRAP[®]有利于通过其全扫描MS / MS谱确认阳性结果，但是将来的工作将研究不同的样品或其他的一些样品前处理以便去除背景干扰。

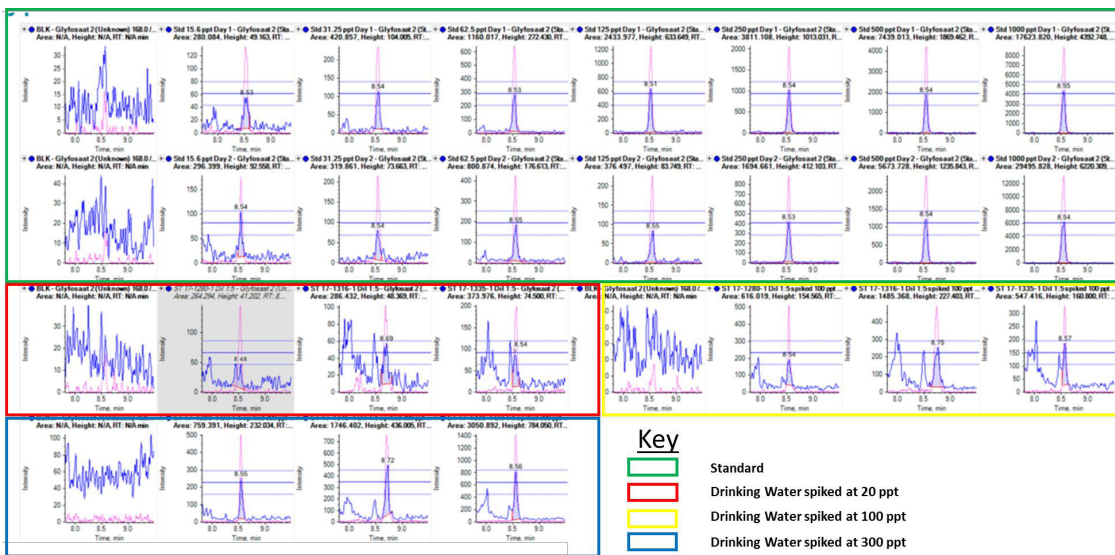
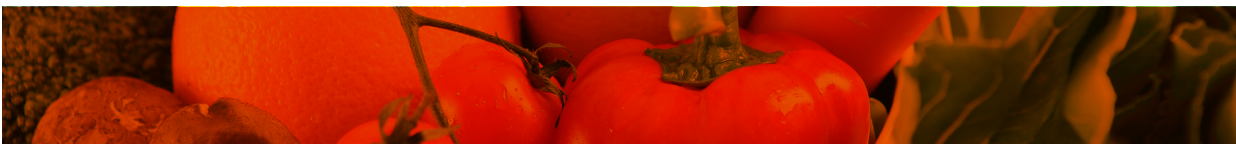


图6. 使用改良水方法从饮用水样品中进行的色谱分析。



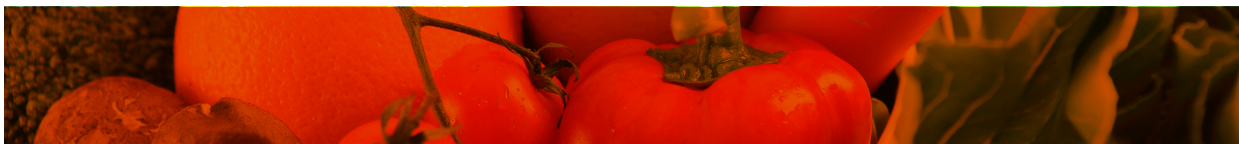
结论

这种分析极性农药的离子色谱方法能够在单次进样中包含多种分析物而无需衍生化。与传统LC缓冲液不同，可以通过MS/MS进行检测，SCIEX QTRAP® 6500+ 质谱仪的灵敏度使得无需使用标准反相LC系统的离子抑制剂即可进行分析。因此，消除了典型农药分析之间改变入口的需要，使高通量实验室能够有效地进行高通量样品分析，并最小化运行成本。系统维护符合预期，仅在大约250次样品注射后才需要更换保护柱。

实验发现这些方法比各种出版物中描述的其他方法更加稳定和灵敏，并且已达到现有和提出的未来法规所需的目标检测限。已经发现分离可以最大限度地减少大多数样品中的基质干扰，但是进一步的工作将研究清理的可能改进，以便在甚至非常复杂的基质中获得确认结果。

参考文献

1. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/glyphosate_en
2. http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPpe.pdf
3. http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=887&LabID=200&Lang=EN
4. http://ec.europa.eu/environment/archives/ppps/pdf/ma_reding_annex4.pdf
5. Glyphosate and AMPA in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality



茶叶中 222 种农药残留的 LC-MS/MS 快速定量和筛查方法

Triple Quad™ 3500 液相色谱-三重四级杆质谱技术

翟南南, 贾彦波, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

中国是举世公认的茶之故乡, 是世界上最早发现、栽培、制作和饮用茶的国家。茶叶已成为中国人的“咖啡”, 饮茶不仅是一种习惯, 还反映了一种文化。但在利益的驱使下, 茶叶危机日益明显, 主要凸显于茶叶品质的“毒化”, “农药茶”的屡禁不止, 使得大量茶产品价格下跌甚至拦腰, 无人敢接手, 市场一片怨声。

为保证茶叶质量, 避免茶叶市场危机更大化, 2016年12月18日, 我国农业部等四个部门发布了《食品安全国家标准食品中最大农药残留限量》(GB2763-2016)(已于2017年6月18日正式实施), 其中规定48项农药在茶叶中的限量要求。

本文主要针对茶叶中农药残留问题, 在 Triple Quad™ 3500 液相色谱质谱联用系统上, 建立了222种农药的快速筛查方法, 为茶叶中农药残留问题提供了简单快速的解决方案。

本方法具有以下特点:

1. 本方法一针进样同时分析222种农药, 分析时间仅20分钟, 大大提高了通量
2. 本方法提供了222种农药质谱条件、液相条件以及保留时间, 大大节省进行方法开发时间, 提高工作效率
3. 本方法提供了茶叶中样品前处理方法, 提取回收率高, 拿来即用, 节省样品前处理摸索时间



仪器设备

SCIEX ExionLC™ 液相系统 + Triple Quad™ 3500 质谱系统

样品前处理

- 称量均质后茶叶样品1 g
- 加入5 mL水, 涡旋30秒, 浸泡10 min
- 加入10 mL乙腈/水/乙酸=70/29/1 (v/v/v), 涡旋30秒
- 加入QuEChERS提取试剂包, 震荡1 min
- 离心5分钟, 转速6000 rpm
- 取上清液2 mL, 加入QuEChERS净化试剂包, 震荡1 min
- 离心5分钟, 转速6000 rpm
- 取上清液1 mL于氮气下吹干
- 200 μ L 乙腈/水=10/90 (v/v) 复溶残渣



液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex Biphenyl
(100 × 3.0 mm, 2.6 μm)

流动相: 水 (5 mM 甲酸铵);
B: 乙腈 (5 mM 甲酸铵)

流速: 0.4 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 20 μL

梯度洗脱

Time (min)	A (%)	B (%)
0.00	95	5
0.50	95	5
3.00	40	60
7.00	20	80
15.0	10	90
16.0	5	95
16.5	3	97
17.0	3	97
17.1	95	5
20.0	95	5

质谱方法

离子源: ESI 源, 正离子模式

离子源参数:

IS 电压: 5500 V 气帘气 CUR: 30 psi

雾化气 GS1: 50 psi 辅助气 GS2: 60 psi

源温度 TEM: 300°C 碰撞气 CAD: Medium

备注: 各化合物质谱参数见附表

实验结果

1. 一针进样, 20分钟内测定222种化合物, 分析时间短

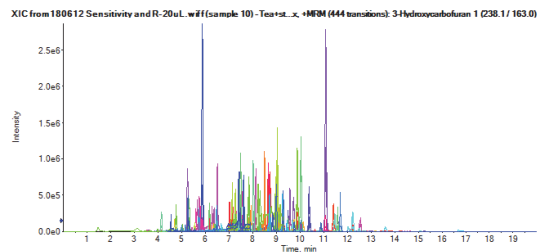


图1. 茶中222种农药的典型色谱图 (10 μg/L)。

2. 该方法提取回收率高, 95%的化合物的提取回收率>70%

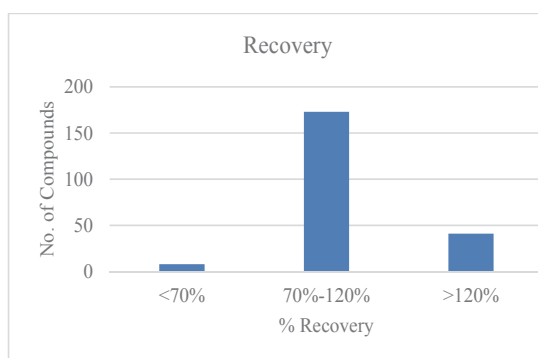
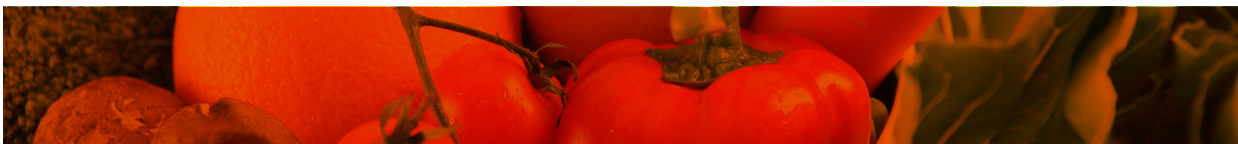


图2. 茶叶中提取回收率统计图。

3. 该方法的重现性好, 可放心用于实际样品测定

表1. 10 μg/L浓度下典型化合物重现性值。

Row	Component Name	Sample Name	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV
1	Acetate 1	10ppb	3 of 3	9.279e4	1.875e3	2.26
2	Acetamidid 1	10ppb	3 of 3	9.411e6	1.302e5	1.38
3	Buprofezin 1	10ppb	3 of 3	1.047e7	3.817e5	3.65
4	Carbendazim 1	10ppb	3 of 3	2.880e6	9.352e4	3.25
5	Carbofuran 1	10ppb	3 of 3	5.169e5	2.237e4	4.33
6	Difenoconazole 1	10ppb	3 of 3	1.799e5	1.216e4	6.76
7	Imidacloprid 1	10ppb	3 of 3	3.113e5	8.899e3	2.86
8	Dimethoate 1	10ppb	3 of 3	9.353e4	5.049e3	6.04
9	Imidaclothiz 1	10ppb	3 of 3	9.546e4	2.537e3	2.65
10	Carap 1	10ppb	3 of 3	7.173e5	5.624e3	0.78



总结

本方法针对茶叶中农药残留问题，在 Triple Quad™ 3500 平台上建立了一套测定茶叶中 222 种农药的 LC-MS/MS 快速筛查检测方法。该方法样品前处理采用 QuEChERS 方法，提取回收率高，易操作，重现性好，可真正用于实际样品中农残的测定。且该方法一针进样，20 分钟内同时检测 222 种农药，高效率高通量。

参考文献

1. European Union Reference Laboratory for Pesticide Residues. Pesticide Analysis in Teas and Chamomile by Liquid Chromatography and Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry.

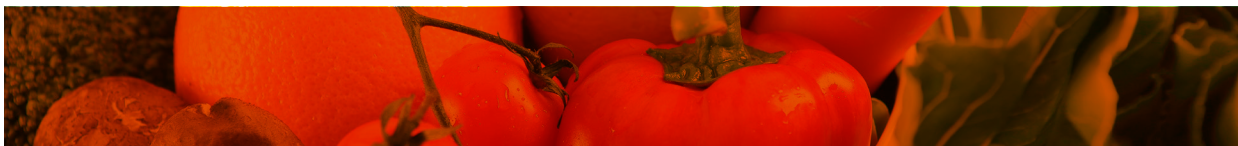
For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8302-ZH-A



快速测定厨房用具，染制品以及食品包装材料中的 33 种初级芳香胺

孙小杰¹，程海燕¹，李立军¹，Jianru Stahl-Zeng²，靳文海¹

¹ SCIEX, Shanghai, CHINA; ² SCIEX, Darmstadt, DE

引言

初级芳香胺 (PAAs) 是一类化合物，其中最简单的形式是苯胺。PAAs 可用于生产某些着色剂 (例如一些偶氮类染料)，尤其是黄 - 橙 - 红色系列的着色剂。虽然大部分 PAAs 都不会威胁人类的健康，但某些 PAAs 却是已知的人类致癌物。某些厨房用具餐巾纸烘焙食品包装袋上印有彩色图文或其他内容，如果它们与食品接触时，其中的 PAAs 迁移到食品中，会对人类健康构成威胁。

由于存在潜在的健康威胁，监管机构规定了特定迁移限量。针对塑料的法规 EU 10/2011 规定：塑料材料及塑料制品不得向食品或食品模拟物中释放超过可检出限量的初级芳香胺，检出限量为每 kg 食品或食品模拟物中不超过 0.01 mg 此类物质。此检出限量的限定对象为释放出的初级芳香胺之总和。同样，此法规要求应用于厨房用具染制品以及食品级包装材料。

小分子碱性化合物分析的挑战和难点

PAAs 分子量比较小，而且都是碱性化合物，在低 PH 值条件下容易电离。由于这些化合物程碱性，并且前处理使用了 3% 乙酸溶液作为样品处理溶剂，一些 PAAs 不能在色谱柱上有保留，而且峰型较差，给色谱分离带来了挑战。同时部分 PAAs 存在同分异构体，给整个分离带来了极大的难度。

本实验的优势以及特点

所有化合物都有良好的峰型以及保留，同时 4



图 1. SCIEX Triple Quad™ 5500 System。

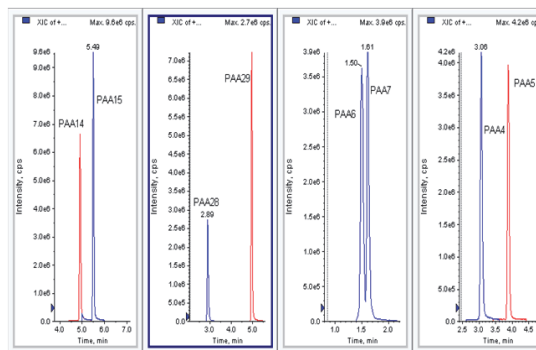


图 2. 在Kinetex F5色谱柱上4种同分异构体的分离。

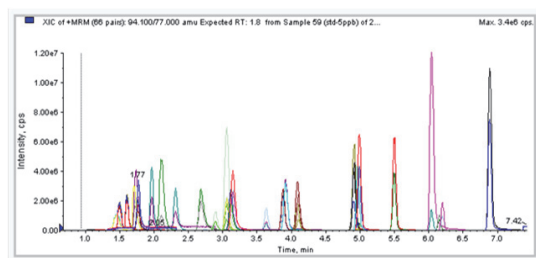


图 3. 33种初级芳香胺提取离子流图。



种同分异构体在 Kinetex F5 都有非常好的分离，详见图 2。

整个分析时间在 12 分钟之内完成，大大提高了分离分析的效率，详见图 3。

在三个不同的浓度 0.1 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL 下，该方法的回收率在 82.1% 到 105.7% 之间，所有化合物的相对标准偏差 RSD% (n=6) 都小于 9% 利用两种模拟溶剂，评估了此方法的基质效应。当使用 20% 乙醇溶剂作为模拟溶剂时，每个化合物均没有基质效应。当使用 3% 乙酸溶剂作为模拟溶剂时，PAA30 和 PAA32 两种化合物大概有 50% 左右的基质抑制效应，有可能是由于这两种化合物跟乙酸存在化学作用，呈现离子状态，导致灵敏度变差。

实验方法

样品前处理

根据欧盟 EU10/2011 的指导原则，所有的样品都是使用 3% 的乙酸溶液和 20% 的乙醇溶液作为提取剂。

对于厨房用具，染制品以及食品包装材料统一制成 1-2 cm² 左右的片状。称取 10 g 左右的样品到 200 mL 容量瓶中，食品级包装材料使用 20% 的乙醇溶剂作为迁移模拟物，在 40 °C 条件下浸泡 7 天。厨房用具以及染制品使用 3% 乙酸溶液作为迁移模拟物，在 100 °C 条件下浸泡 2 个小时左右。

在回收率实验中，选取了不含有此类化合物的空白样品进行实验，实际进行了三个浓度水平的加标测试，在 0.1, 5, 20 ng/mL 三个浓度下，通过上述的前处理提取方法进行分析。三个浓度加标均进行了 6 次平行实验，进行回收率的计算以及方法重现性实验。

液相分离条件以及质谱条件

液相系统：SCIEX ExionLC™ AD

色谱柱：Phenomenex, Kinetex 2.6 μm F5 100 Å, 100 × 3.0 mm

流动相：A 0.05% Formic Acid; B MeOH

流速：0.3 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：5 μL

运行时间：12 min

梯度洗脱条件详见表 1

表 1. 液相梯度分离条件。

Time (min)	A (%)	B (%)
0	70	30
7	10	90
9	5	95
9.1	70	30
12	70	30

质谱：SCIEX Triple Quad™ 5500 System

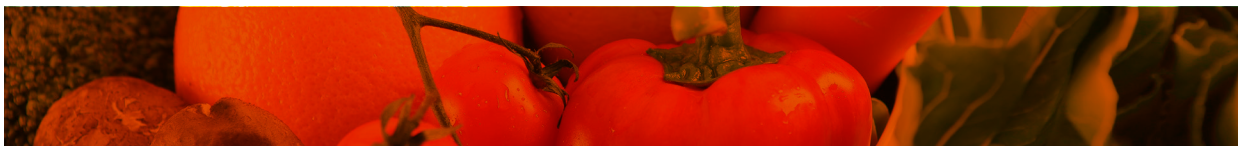
采集方式：Scheduled MRM™

离子源参数详见表 2

表2. SCIEX Triple Quad™ 5500 LC-MS/MS系统离子源参数。

Source Parameters

Curtain Gas(CUR)	30psi
Collision Gas(CAD)	9psi
IonSpray Voltage(IS)	1200v
Temperature(TEM)	600° C
Ion Source Gas(GS1)	65psi
Ion Source Gas(GS2)	60psi



色谱条件优化

在色谱条件优化过程中，首先考虑进行所有化合物色谱峰型以及保留时间的优化。从实验中得知，起始流动相的比例以及 PH 值的变化，都会对分离以及灵敏度产生很大的影响。所以本实验重点研究了甲醇和己腈的选择，初始流动相比例的选择，色谱柱的选择以及甲酸添加浓度的选择。在详细讨论甲酸含量的选择上，我们通过添加不同浓度的甲酸浓度，进行灵敏度的对比，在甲酸浓度为 0.0%，0.01%，0.05%，0.1% 以及 0.2% 的优化选择中，发现浓度为 0.05% 时，所有化合物的相应都是最佳，最终固定了水中甲酸浓度的添加水平为 0.05%。

同时，在选择甲醇或己腈作为洗脱相时，进行了详细的对比，通过灵敏度实验，发现在甲醇体系里，所有化合物灵敏度均优于在己腈的体系中，故而选择甲醇作为洗脱相。流动相起始比例的变化，对极性较强的化合物灵敏度有非常大的影响，所以在兼顾化合物分离以及灵敏度的同时，进行了梯度起始比例的优化。

通过优化发现，当甲醇含量越来越高时，大部分化合物的灵敏度都得到了很大的提高，同时也发现，部分同分异构体不能完全分离，最终在兼顾灵敏度以及分离度的前提下，选择了 30% 的甲醇作为梯度分离的起始比例。本实验中，化合物数量偏多，极性分布比较宽，为了保证每个化合物都有良好的保留行为以及峰型，又要提高分离效率，故对部分色谱柱进行优化选择。通过对比发现，在 Phenomenex Omega; Phenomenex F5; Waters HSS T3 中，Phenomenex F5 能够提供更好的分离效果，对同分异构体有比较好的分离，所以最终选择了 Phenomenex F5 作为本实验的分离色谱柱。

质谱条件优化

本实验在 SCIEX Triple Quad™ 5500 系统上进行，选择了电喷雾电离源。每个化合物都严格根据欧盟的要求，选择两个子离子进行定量定性分析。每个化合物的优化参数详见表格 3。数据采集使用了 Analyst® 1.6.3 软件，数据处理以及定性分析使用 MultiQuant™ 3.0.2 软件。除了同分异构体外的 25 种 PAAs 的提取离子流图详见图 4。

为了获得最佳的灵敏度，本实验对离子源参数部分进行了详细的优化，在进行离子源喷雾电压优化时发现，当电压越来越小时，灵敏度反而越来越强，所以进行了离子源喷雾电压的优化。最终发现，当电压设定为 1200 v 时，所有化合物的灵敏度都是最佳。图 5 详细的展示了不同离子源喷雾电压对每个化合物灵敏度的影响。

结果和讨论

分析方法验证结果

重现性实验，通过在实际空白样品中添加 0.1 ng/mL, 5 ng/mL, 20 ng/mL 的标准品，通过两种模拟提取液进行提取实验，每种化合物的重现性 (RSD%) 都在 1.9% 到 8.9% 范围内。在不同时间下，测得所有化合物的日间重现性都在 2.3% 到 9.1% 范围内。

回收率实验，30 种化合物的平均回收率均 85%，另外有 3 种化合物的平均回收率在 60-85% 之间。详细结果见表 4。

线性实验，在浓度 0.05-50 ng/mL 范围内进行实验，每种物质均有良好的线性关系，相关系数均在 0.992-0.999 范围内。所有化合物的最低检出限 LODs 都在 0.001-0.029 ng/mL 范围内。最低检出限均远远低于欧盟法规 No.10/2011 塑料制品中初级芳香胺的

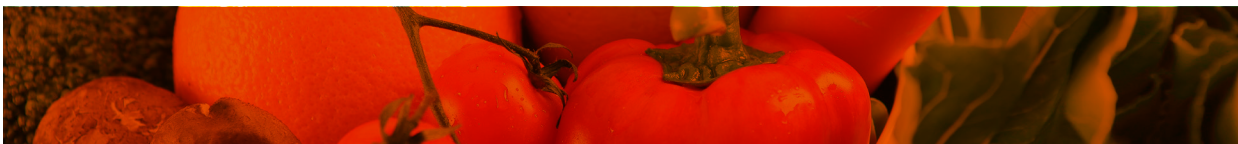


表 3. List of analytes with MRM transitions.

Compound	MH+	Product ion(Q/C) ^a
Aniline (PAA 1)	94.1	77/51
o-Toluidine (PAA 2)	108	91.1/93
m-phenylenediamine (PAA 3)	109	92/65
2,4-dimethylaniline (PAA 4)	122	77.1/105.1
2,6-dimethylaniline (PAA 5)	122	77.1/105.1
2,4-diaminotoluene (PAA 6)	123.1	106.1/77.1
2,6-diaminotoluene (PAA 7)	123.1	106.1/77.1
o-Anisidine (PAA 8)	124.1	109.1/65
4-chloroaniline (PAA 9)	128.1	93.1/75
2,4,5-trimethylaniline (PAA 10)	136	91.1/121.1
p-cresidine (PAA 11)	138	123.1/78
4-methoxy-1,3'-phenylenediamine (PAA 12)	139	124.1/108.1
2-naphthylamine (PAA 13)	144	127/77.1
4-aminobiphenyl (PAA 14)	170	152/153.1
2-aminobiphenyl (PAA 15)	170	152/153.1
4,4'-diaminobiphenyl (PAA 16)	185	168.1/167
4-aminoazobenzene (PAA 17)	198	77.1/105.1
Bis-(4-aminophenyl)methane (PAA 18)	199	106.1/77
4,4'-oxydianiline (PAA 19)	201	108.1/184
3,3'-dimethylbenzidine (PAA 20)	213	180/196.1
4,4'-diaminodiphenylsulfide (PAA 21)	217	124/200
o-Aminoazotoluene (PAA22)	226	91/121.1
4,4'-diamino-3,3'-dimethylphenylmethane (PAA 23)	227	120.1
3,3'-dimethoxybenzidine (PAA 24)	245.1	230.1/187.1
3,3'-dichlorobenzidine (PAA 25)	253.1	217.1/182.1
4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline) (PAA 26)	267	231.1/140.1
3-amino-4-methylbenzamide (PAA 27)	151	108.1/93
3-chloro-4-methoxyaniline (PAA 28)	158	123.1/80.1
5-chloro-2-methoxyaniline (PAA 29)	158	143/108.1
1,5-diaminonaphthalene (PAA 30)	159	115.1/143.1
4-chloro-2,5-dimethoxyaniline (PAA 31)	188	173.1/130
3-amino-p-anisilide (PAA 32)	243	212.1/227
2-methoxy-4-nitroaniline (PAA 33)	169	152/122.1

Note: ^a (Quantitation Ion / Confirmation Ion)

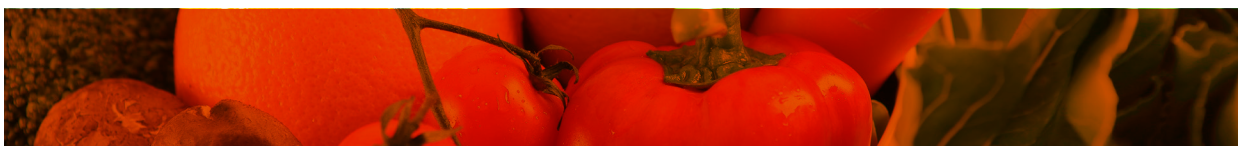


表 4. Main analytical parameters a.

PAA	Equation	R	LOD(ng/ml)	LOQ(ng/ml)	RSD(%)	Rec(%)
Aniline	$y=1.905e6x+1.604e5$	0.9962	0.029	0.09	8.9	94.2
o-Toluidine	$y=2.12e6x+14137$	0.9981	0.012	0.04	3.67	87.4
m-phenylenediamine	$y=1.329e6x+10356$	0.9998	0.02	0.062	2.22	106.1
2,4-dimethylaniline	$y=1.7840e6x+8177$	0.9977	0.01	0.041	2.08	103.4
2,6-dimethylaniline	$y=1.6121e6x+25871$	0.9975	0.009	0.033	1.9	105.9
2,4-diaminotoluene	$y=1.444e6x+23110$	0.9995	0.011	0.045	4.12	98.3
2,6-diaminotoluene	$y=1.23246e6x+20386$	0.9930	0.008	0.028	2.89	94.3
o-Anisidine	$y=4.354e6x+3.0078e4$	0.9945	0.0049	0.015	4.83	100.9
4-chloroaniline	$y=1.1465e6x+5264$	0.9987	0.0048	0.021	4.9	86.8
2,4,5-trimethylaniline	$y=2.5363e6x+25932$	0.9972	0.01	0.034	3.68	91.9
p-cresidine	$y=6.667e6x+3.307e4$	0.9966	0.001	0.0045	3.98	99.4
4-methoxy-1,3'-phenylenediamine	$y=5.8050e6x+2242$	0.9993	0.01	0.05	3.20	109.5
2-naphthylamine	$y=2.5801e6x+3999.3$	0.9991	0.005	0.016	2.96	105.5
4-aminobiphenyl	$y=2.8274e6x+8232.5$	0.9972	0.01	0.038	4.30	89.1
2-aminobiphenyl	$y=3.8334e6x+4.6294e4$	0.9899	0.01	0.030	4.16	87.9
4,4'-diaminobiphenyl	$y=1.5268e6x+13989$	0.9984	0.005	0.019	3.09	93.1
4-aminoazobenzene	$y=1.4826e6x+7.47e5$	0.9958	0.001	0.0036	3.25	91.0
Bis-(4-aminophenyl)methane	$y=3.0494e6x+3.23e4$	0.9980	0.005	0.018	2.65	98.2
4,4'-oxydianiline	$y=2.2383e6x+18163$	0.9987	0.001	0.0033	2.08	95.5
3,3'-dimethylbenzidine	$y=2.269e6x-8183$	0.9990	0.01	0.045	2.77	107.3
4,4'-diaminodiphenylsulfide	$y=1.769e6x+9944$	0.9988	0.01	0.048	3.46	106.1
o-Aminoazotoluene	$y=1.1079e7x+4.6817e5$	0.9944	0.001	0.0041	4.03	86.0
4,4'-diamino-3,3'-dimethylphenylmethane	$y=3.4679e6x+29360$	0.9955	0.005	0.015	3.49	85.8
3,3'-dimethoxybenzidine	$y=2.6076e6x+5.7198e4$	0.9955	0.05	0.13	3.37	100.7
3,3'-dichlorobenzidine	$y=6.5351e6x+27514$	0.9992	0.01	0.030	3.33	99.5
4,4'-methylene-bis(2-chloroaniline)	$y=1.0702e6x+4.7568e4$	0.9986	0.005	0.0178	3.54	101.1
3-amino-4-methylbenzamide	$y=3.0257e6x+27540$	0.9952	0.005	0.0164	3.66	109.4
3-chloro-4-methoxyaniline	$y=1.0783e6x+3546$	0.9997	0.01	0.0334	3.15	102.3
5-chloro-2-methoxyaniline	$y=2.8078e6x+26640$	0.9957	0.005	0.0152	3.45	85.2
1,5-diaminonaphthalene	$y=1.4086e6x+2846$	0.9992	0.02	0.068	2.59	64.2
4-chloro-2,5-dimethoxyaniline	$y=3.681e6x+4.046e4$	0.9923	0.005	0.0193	4.23	86.4
3-amino-p-anisilide	$y=2.269e6x+2.763$	0.9962	0.05	0.163	3.17	69.1
2-methoxy-4-nitroaniline	$y=4.946e6x+25359$	0.9956	0.005	0.0152	2.69	88.3

Note: ^a Calibration curve equations, regression coefficients (R), limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), repeatability of three different concentrations, and mean recovery of 3 (0.1, 5, 20 ng/ml) spike levels.

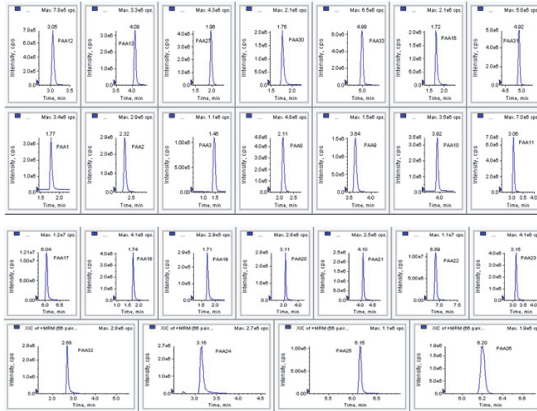


图 4. 25 PAAs 提取离子流图。

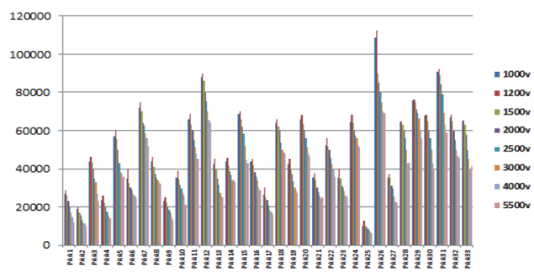


图 5. 离子源喷雾电压的优化结果。

限量要求。

样品分析结果

本实验研究的样品信息详见表 5，所有样品均来源于市场。利用外标法以及标准曲线进行样品测定，三类样品的测定结果详见表 6。

表 5. 样品的详细信息。

样品类型		
厨房用具	塑料勺子	5
	塑料叉子	5
	一次性纸杯	2
染制品	染色纸巾	5
食品包装材料	塑料饼干类 包装袋	5

在这些样品中，部分 PAAs 有检出，但是所有检出

化合物浓度总量在 10 ng/mL 以下，没有超出 (EU) No.10/2011 对塑料制品总含量的要求。图 6 展示了在部分样品中检测出的一些 PAAs 类化合物色谱图信息。

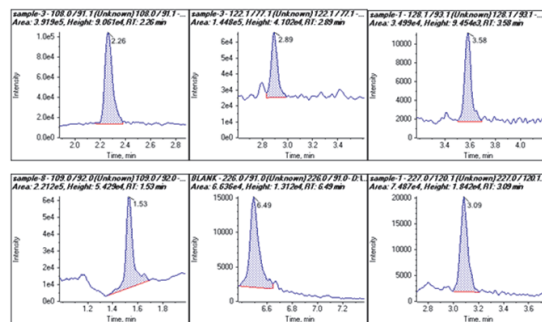


图 6. 部分样品检出的 PAAs 类化合物色谱图。

总结

本实验开发了针对厨房用具，染料制品以及包装材料中多种初级芳香胺的快速检测方法。

样品的前处理简单快捷，所有化合物均具有良好的回收率，线性关系以及重现性，每种化合物均可以在 50 ng/mL 以下具有较宽的线性范围。

待测样品均有部分化合物检出，但实际总含量均远低于 (EU) No. 10/2011 法规的要求，即所测总含量低于 0.01 mg/kg。

参考文献

1. Commission regulation (EU) No.10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union L 12, 15.1.2011. <http://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2011/10/oj>



表 6. Some detected PAAs in samples.

PAA	Plastic Spoon	Plastic Fork	Paper cup	Napkin	Plastic packaging
o-Toluidine	0.05	0.04	N/A	0.07	0.04
M-phenylenediamine	0.04	N/A	N/A	0.04	N/A
2,4-dimethylaniline	N/A	N/A	N/A	0.13	0.038
2,6-diaminotoluene	0.048	0.078	0.057	0.088	N/A
4-chloroaniline	N/A	N/A	N/A	0.061	N/A
4,4-diaminobiphenyl	N/A	N/A	N/A	0.138	N/A
Bis-(4-aminophenyl)methane	0.023	0.031	N/A	0.23	N/A
4,4'-oxydianiline	0.047	0.038	N/A	0.028	N/A
4,4'-diaminodiphenylsulfide	N/A	N/A	N/A	0.025	N/A
o-Aminoazotoluene	N/A	N/A	0.02	0.027	0.021
4,4'-diamino-3,3'-dimethylphenylmethane	N/A	N/A	0.065	0.022	N/A
3,3'-dichlorobenzidine	N/A	0.155	N/A	N/A	N/A
3-amino-4-methylbenzamide	N/A	N/A	N/A	0.136	N/A
3-chloro-4-methoxyaniline	0.32	N/A	N/A	N/A	N/A
5-chloro-2-methoxyaniline	N/A	0.197	N/A	0.222	0.049
3-amino-p-anisilide	0.06	N/A	N/A	0.04	N/A

Note: unit, ng/ml; N/A, not detected

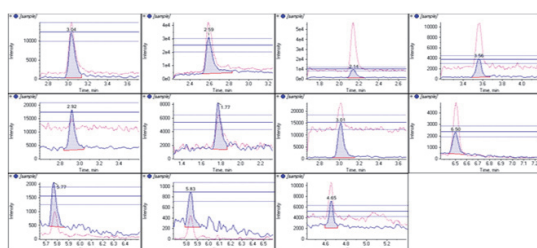


图 7. 样品中部分PAAs检出结果展示。

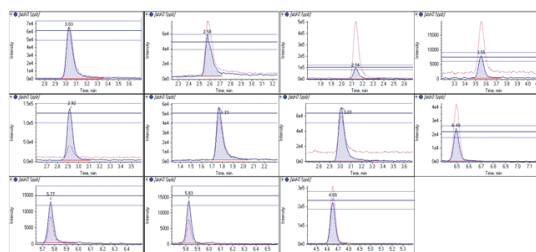
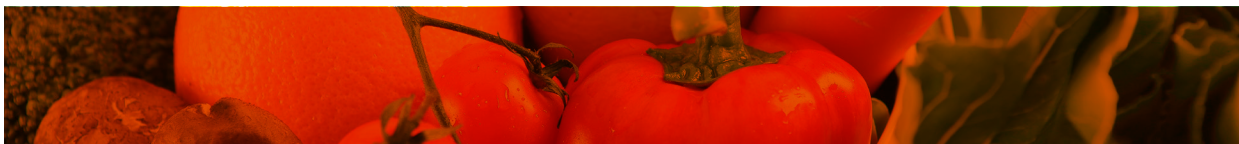


图 8. 部分PAAs标准品色谱图。



使用 SCIEX X500R QTOF 系统，结合非靶向 SWATH[®] MS/MS^{ALL} 采集与高选择性 MRM^{HR} 分析组织中的兽药

Jasmin Meltretter

SCIEX, Landwehrstraße 54, Darmstadt, Germany

概述

为分析肝脏提取物中的兽药残留，我们建立了一种高灵活性、高选择性、高灵敏度的 LC-MS/MS 方法：SCIEX X500R QTOF 高分辨率质谱仪结合 SCIEX OS 软件，提供了一个非靶向与靶向相结合的筛查工作流程。

引言

在畜牧业，为防治动物感染，确保其最佳生长，经常会用到兽药。尽管法律规定，从使用药物活性成分到动物被屠宰用于食品加工，有一个等待期。但是仍然在人类食物中发现了兽药残留给人类健康带来潜在风险。例如可能出现过敏反应或生殖障碍。此外，对动物滥用抗生素也可能造成耐药。

因此，欧洲指导原则要求认真、严格地控制动物制品中的兽药残留^[1]。我们在 SCIEX X500R QTOF 系统上建立了一个全面、灵敏的工作流程，使用 SWATH[®] 数据采集的非靶向筛查工作流程与高选择性 MRM^{HR} 采集相结合。通过通过 SCIEX OS 软件进行数据分析，得出母离子和碎片离子的准确质量数以及化合物的特定离子对比率，进行兽药残留的鉴定，获得满足法规要求^[2]的自信结果。

材料和方法

样品制备

肝脏组织与提取溶液（乙腈、水、甲酸）混合并均质化。离心 5 分钟后取 5mL 等份的上清液在氮气流下浓缩吹干。加入 2.5 mL 的溶剂 A 后，提取物进行涡旋、离心并过滤，然后进样。等份的提



图 1. SCIEX X500R QTOF 系统。

取物用标准溶液加标，产生最终浓度 0.2、1、5、10 和 50 ng/mL（对应于 0.08、0.4、2、4 和 20 µg/kg 肝脏组织）。

LC 法

SCIEX ExionLC[™] AD UHPLC 系统，Phenomenex Kinetex C18 色谱柱（150 x 2.1 mm, 2.6 µm）进行色谱分离。流动相 A：含有 5% 乙腈和 0.3% 甲酸的水。流动相 B：含有 5% 水和 0.3% 甲酸的乙腈。使用以下梯度实现色谱分离。柱温箱温度 30 °C，进样量 5 µL。

	A[%]	B[%]	流速 [mL/min]
0.0 分钟	100	0	0.4
2.0 分钟	100	0	0.4
7.0 分钟	70	30	0.4
11.0 分钟	0	100	0.4
11.1 分钟	0	100	0.8
12.5 分钟	0	100	0.8
12.6 分钟	100	0	0.4
14.0 分钟	100	0	0.4



Method duration: 16 min | Total scan time: 0.533617 sec | **兼容 UHPLC 的循环时间**

Estimated cycles: 1799

Source and Gas Parameters

Ion source gas 1: 40 psi | Curtain gas: 35 | Temperature: 500 °C
 Ion source gas 2: 70 psi | CAD gas: 7

Experiment | SWATH

Polarity: Positive | Spray voltage: 5000 V

TOF MS

TOF start mass: 115 Da | Declustering potential: 60 V | Collision energy: 10 V
 TOF stop mass: 950 Da | DP spread: 0 V | CE spread: 0 V
 Accumulation time: 0.08 s

TOF MSMS

TOF start mass: 50 Da | TOF stop mass: 950 Da | Dynamic collision energy:
 Accumulation time: 0.04 s | Charge state: 1

Mass Table | **可变 SWATH Q1 窗口** | **通用的 SWATH 参数**

	Precursor ion start mass (Da)	Precursor ion stop mass (Da)	Declustering potential (V)	DP spread (V)	Collision energy (V)	CE spread (V)
1	114.5000	237.8000	60	0	35	15
2	236.8000	356.0000	60	0	35	15
3	355.0000	444.9000	60	0	35	15
4	443.9000	501.7000	60	0	35	15
5	500.7000	537.6000	60	0	35	15
6	536.6000	578.1000	60	0	35	15
7	577.1000	705.8000	60	0	35	15
8	704.8000	949.7000	60	0	35	15

Experiment | MRM HR

TOF MSMS

Apply fragment ion mass | **类似 QQQ 的 MRM^{HR} 设置** | Apply Scan Schedule | **优化的 MRMS^{HR} 参数** | **Scheduled MRM^{HR} 扫描设置**

Compound ID	Group name	Precursor ion (Da)	Fragment ion (Da)	Accumulation time (sec)	Declustering potential (V)	Collision energy (V)	Retention time (min)	Retention time tolerance (+/- sec)
1	Metronidazol_MRM	172.07	128.0449	0.0500	105	16	2.39	8
2	Sulfamerazin_MRM	265.08	156.0114	0.0500	80	20	5.42	8
3	Danofloxacin_MRM	358.16	340.1461	0.0500	145	28	6.28	10
4	Clenbuterol_MRM	277.09	203.0141	0.0500	130	20	6.25	8
5	Azithromycin_MRM	749.52	591.4173	0.0500	140	38	7.07	8
6	Oxolinskure_MRM	262.07	244.0608	0.0500	100	25	8.16	12
7	Clotrimazol-frag_MRM	277.08	165.0689	0.0500	40	24	9.15	8
8	Rifampicin_MRM	823.41	791.3882	0.0500	45	22	9.70	8
9	Salinomycin NH4_MR...	768.53	733.4874	0.0500	80	25	12.37	8

Figure 2: MS Method in SCIEX OS.

MS 方法

SCIEX X500R QTOF 系统，正离子模式，电喷雾电离。数据采集：TOF MS，结合 8 个 SWATH MS/MS 实验，以及 Scheduled MRM^{HR}。SWATH 采用了 Q1 可变窗口，通过 SCIEX SWATH 可变窗口计算器进行计算。MRM^{HR} 实验在碎片模式下采集，TOF 扫描窗口为 20 Da。SCIEX OS1.3 软件进行数据处理。



结果和讨论

定量结果

在 SCIEX X500R QTOF 系统上, TOF-MS 模式是定量的标准采集模式, 提供非靶向数据采集, 随后可在 SCIEX OS 中使用一系列靶向化合物处理。对于 27 种相关分析物, TOF-MS 模式在 1 ng/mL 浓度的标准溶液中提供卓越的灵敏度, 如图 3 所示。

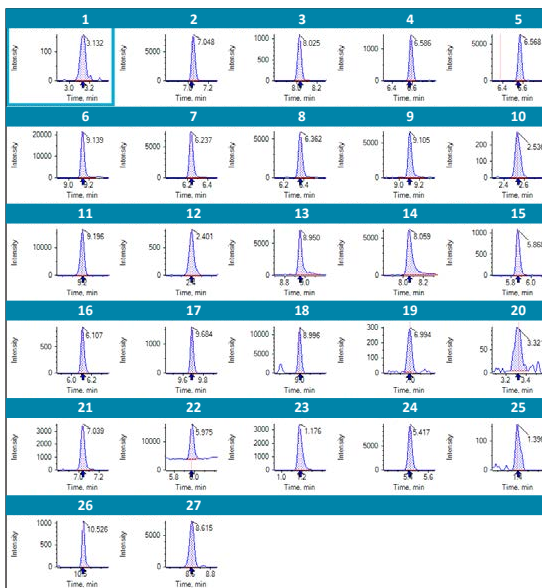


图 3. 1 ng/mL 兽药标准溶液的提取离子色谱图。1 阿莫西林, 2 阿奇霉素, 3 头孢噻唑, 4 金霉素, 5 克仑特罗, 6 克霉唑, 7 达氟沙星, 8 恩诺沙星, 9 氟甲唑, 10 羟甲基甲硝咪唑, 11 交沙霉素, 12 甲硝唑, 13 萘啶酸, 14 恶喹酸, 15 氧四环素, 16 青霉素 G, 17 利福平, 18 罗红霉素, 19 螺旋霉素, 20 磺胺醋酰, 21 磺胺氯达嗪, 22 磺胺二甲嘧啶, 23 磺胺脒, 24 磺胺甲基嘧啶, 25 磺胺, 26 三氯苯哒唑砒, 27 泰乐菌素 A

但在肝脏提取物等非常复杂的基质中, 干扰物可能妨碍某些分析物的灵敏检测。例如, 基质中的阿奇霉素在 0.2 ng/mL 下加标的信号显示某种基质干扰, 产生肩峰, 如果根据此进行积分, 难以得出准确的定量结果(见图 4 左图所示)。在这种情况下, 可以使用 SWATH[®] 采集(一种独特的 MS/MS^{ALL} 技

术 - 基质干扰低) 中的全面 MS/MS 进行痕量成分定量, 提高选择性。使用像 MRM 一样选择性较高的技术提取 SWATH[®] 碎片, 可以去除在 TOF-MS 中的干扰物(图 4 的中图所示)。如果需要更高的选择性和灵敏度, 真正 MRM^{HR} 可以提供更好的信噪比(图 4 的右图所示)。信噪比性能的提高源于 MRM^{HR} 使用化合物特定的碰撞能量、CE、去簇电压(DP 电压), 而 SWATH[®] 是一种通用的方法。再有, 母离子和碎片离子经过质谱仪的传输也进行了优化。此外, MRM^{HR} 的高度选择性将色谱图中的噪声降至最小。

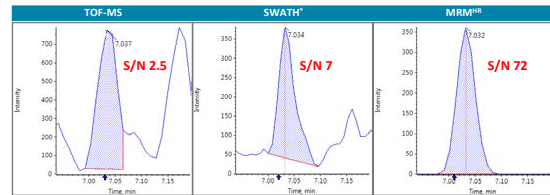


图 4. 不同采集方法的肝脏提取物中阿奇霉素加标在 0.2 ng/ml 的浓度下的提取离子流色谱图。左图: TOF-MS (m/z 749.5158)。中图: SWATH[®]-MS/MS (749.52 > 591.4215)。右图: MRM^{HR} (749.52 > 591.4215)。

定性结果

SCIEX OS 可以显示多个参数, 能够可靠地鉴定检测到的信号, 符合欧盟的鉴定点数^[2]。首先, 它会计算母离子和碎片离子的质量误差。其次, 将从未知样品中测量的离子比率与从标准液计算的离子比率进行比较。质量误差和离子比率置信度通过信号灯标示清晰地显示, 使用绿色勾选符号表示符合鉴定标准的信号。这便于用户轻松地查看大量的数据并快速筛选出明确检测的化合物(图 5)。

通常, 可以根据母离子面积和一个碎片的面积计算离子比率。或者, 如果 TOF-MS 小的色谱峰被干扰物干扰, 则可使用两个 MS/MS 碎片。MS/MS 碎片可从 SWATH[®] 实验中获取, 如果需要更高选择性, 则可从 MRM^{HR} 实验获取。

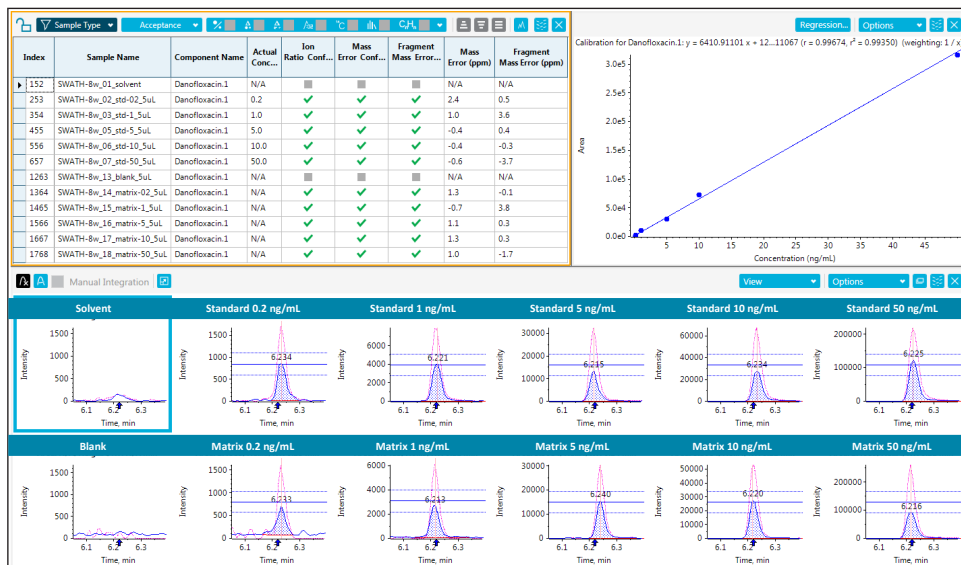
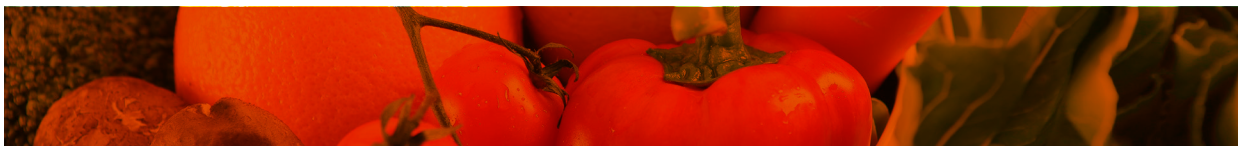


图 5. SCIEX OS 中显示的达氟沙星定量和定性结果。左上图：显示母离子和碎片离子的离子比率和质量误差置信度的结果表。右上图：校准曲线。下图：标准溶液和基质样品的提取离子色谱图。定量 (TOF-MS) 以粉红色显示。定性 (SWATH® 中的 MS/MS 碎片) 以蓝色显示。预期离子比率以蓝色实线显示，容许的误差 (± 30%) 以虚线显示。

结论

SCIEX X500R QTOF 系统是一款功能强大的仪器，可灵敏地分析复杂基质中的兽药残留也可根据不同需求采用独特的多功能采集模式：

- 1) TOF-MS 数据作为用于量化的标准。
- 2) 非靶向 SWATH® MS/MS 数据的同时采集，用于根据法规指导原则的要求，通过精确的碎片质量和化合物特定离子比率进行鉴定。此外，如果 TOF-MS 色谱峰有干扰物，SWATH® MS/MS 碎片也可用于定量。
- 3) 靶向 MRM^{HR} 数据的同时采集提高了对

TOF-MS 和 SWATH® MS/MS 模式下有干扰的分析物的选择性。

参考文献

- 1) European Commission, Commission Decision 37/2010/ EU of 22 December 2002. ABL :L15/1-72 (2002)
- 2) European Commission, Commission Decision 2002/657/ EC of 12 August 2002. ABL L221, 8-36 (2002)

致谢

感谢瑞士苏黎世 Cantonal 实验室的 Anton Kaufmann 提供肝脏提取物和色谱法。

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2017 AB Sciex. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

Document number: RUO-MKT-02-6409-A



Headquarters
500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
scieux.com

International Sales
For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at scieux.com/offices



使用 LC-MS/MS QTRAP® 4500 系统同时分析烘焙食品和生食产品中的 12 种食品过敏原检测

12种易产生过敏的食品过敏原的特征多肽测定

Lee Sun New¹、Rahul Baghla²、André Schreiber³、Jianru Stahl-Zeng⁴ 和 Hua-Fen Liu⁵

¹ SCIEX 新加坡; ² SCIEX 哈里亚纳邦古尔冈 (印度); ³ SCIEX 安大略省康科德 (加拿大); ⁴ SCIEX 达姆施塔特 (德国); ⁵ SCIEX 加利福尼亚雷德伍德城 (美国)

引言

食物过敏是对抗原蛋白的一种免疫介导性负面反应。对于敏感的人,即使是有限暴露于抗原也可能引起严重的反应,导致皮疹、口腔发痒与肿胀、恶心、腹泻和哮喘。此外,食物过敏也是过敏症(一种急性的潜在致命性过敏反应)的主要原因。食物过敏的患病率和严重性也在上升,全世界约有 1.5 亿人遭受食物过敏的痛苦。^{1,2} 目前,食物过敏无法治愈,患者必须依靠食品的正确标记来避免接触过敏原。因此,必须开发灵敏且准确的分析方法来筛查食品中的过敏原,以预防可能威胁过敏症患者生命的健康问题。

酶联免疫吸附实验 (ELISA) 是最常用的过敏原筛查方法。ELISA 检测虽然非常快速简便,但选择性有限,而且容易交叉反应,可能导致误报或漏报结果。此外,大多数 ELISA 检测每次只能检测一种过敏原,需要多次检测才能筛查一个食品样品中的多种过敏原。因此,能够明确地确认并鉴定多种过敏原的方法对食品筛查非常重要。

本文将介绍 LC-MS/MS 方法,它使用 QTRAP® 4500 LC-MS/MS 系统,可在一次进样中同时检测并筛查 12 种不同的致敏蛋白。用此方法检测的过敏原选自国际食品法典委员会 (Codex Alimentarius) 提出的指导方针。这些指导方针是联合国粮食农业组织 (FAO) 和世界卫生组织 (WHO) 开发,旨在统一国际食品标准。³



食品法典建议食品包装标签上应注明 8 种过敏性食品:谷物、贝类、蛋类、鱼类、豆类、牛奶、亚硫酸盐、坚果。³ 此方法可以检测出其中五种食品,包括蛋类、牛奶、花生、大豆和坚果(杏仁、巴西坚果、腰果、榛子、碧根果、松子、开心果和核桃)。

为了评估食品中的过敏原成分(原材料和烘焙食品),对食品匀浆消化后的样品,鉴定每种过敏原食品的几个特征性的肽段。已知浓度的 12 种过敏原标准溶液添加到烘焙食品的基质中(面包或饼干),通过 Scheduled MRM 同时测定测定过敏食品的特征性肽段和 12 种过敏原的特征肽段。目前,该方法可以检测 5 类过敏食品中的过敏原,在不同的食品基质中,检测限均能达到 10ppm。



图 1. 使用 SCIEX TripleTOF® 6600 系统和 ProteinPilot™ 软件的特征多肽选择工作流程。

实验

样品制备

面包和饼干匀浆样品，添加了未烘焙的无麸质面包或饼干混合物（100 克），其中以下 12 种过敏食物含 10 至 500 ppm（按重量）：蛋类、牛奶、花生、大豆、杏仁、巴西坚果、腰果、榛子、碧根果、松子、开心果和核桃。然后，根据制造商的说明烹

调强化食品。食品样品（坚果、烘焙食品）使用咖啡研磨机磨成匀浆。每份匀浆（1 克）使用己烷提取两次并在通风柜中干燥，以进行脱脂。向脱脂的匀浆加入提取缓冲液（4 mL），离心后再去除上清液（500 μL）。在上清液中加入还原剂（50 μL），在 60°C 下持续 1 小时。冷却（25°C）后，使用半胱氨酸阻断剂（25 μL）烷基化样品。向氯化钙 / 碳酸氢铵缓冲液中的修饰蛋白加入胰蛋白酶（20 μg）（3 至 12 小时），

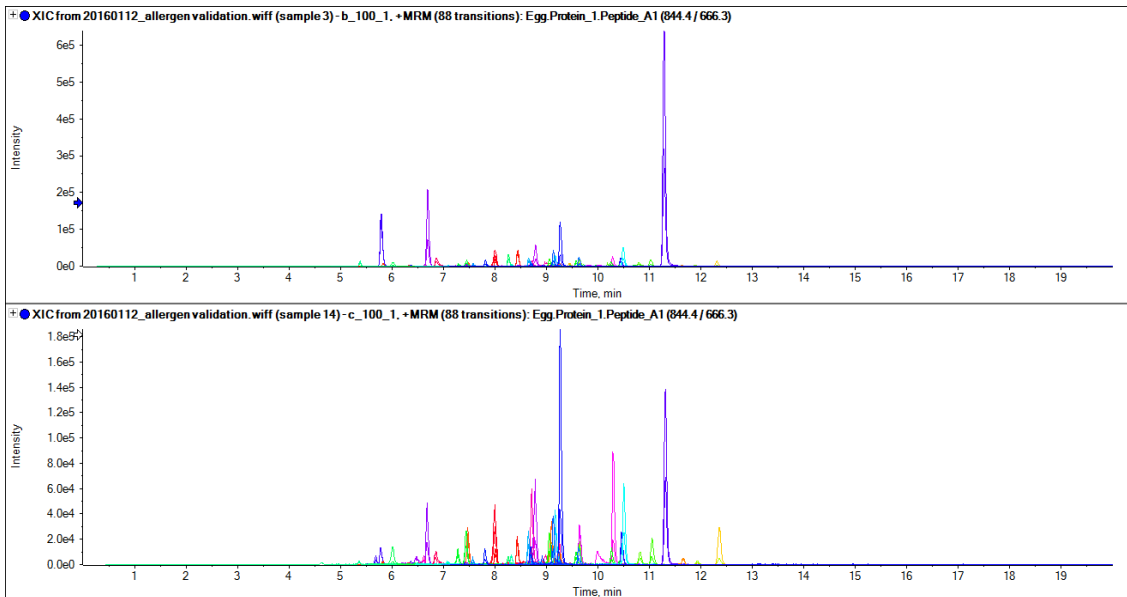


图 2. 使用 100 ppm 鸡蛋、牛奶、花生、大豆和坚果蛋白质强化的面包（上）和饼干（下）匀浆进行 LC-MS/MS 分析所产生的提取离子色谱 (XIC)。显示了多个对应于过敏性胰蛋白酶肽的峰值。



以获取用于特征多肽分析的胰蛋白酶肽，然后使用甲酸 (30 μL) 中和。消解的样品 (500 μL) 使用 10 kDa MWCO 过滤器过滤后再进行 LC-MS/MS 分析。

LC 分离

胰蛋白酶肽 (30 μL 进样量) 使用 Phenomenex Kinetex C18 色谱柱 (2.6 μm , 100 x 3 mm) 的 Shimadzu Prominence UFLCXR 系统进行色谱分离。线性梯度, 分析时间 12 分钟, 流速为 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, 流动相: 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈溶液。

MS/MS 检测

为鉴定用于过敏原筛查的特征多肽, 使用 TripleTOF[®] 6600 LCMS/MS 系统采集了各种过敏食品 (鸡蛋、牛奶、花生、大豆和坚果) 的多肽图谱 (图 1)。在“结果和讨论”中可以找到更详细的特征多肽选择策略。

为筛查食品中的过敏原, 在正 ESI 模式下采用了带有 Turbo V[™] 离子源的 SCIEX QTRAP[®] 4500 系统, 离子源温度为 500 $^{\circ}\text{C}$ 。使用 Scheduled MRM[™], 在一次进样中通过检测多重 MRM 离子对中的过敏性特征多肽来分析食品样品中的 12 种过敏原。

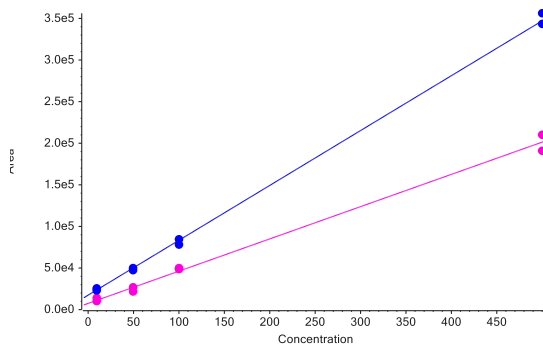


图3a. 榛子多肽校准曲线 (0~500ppm)。同时检测两个 MRM 离子对, 第一个碎片离子对 (蓝色) 和第二个碎片离子对 (粉色)

结果和讨论

根据以下条件为每个过敏原选择特征多肽: 1) 它们与本底蛋白相比的唯一性; 以及 2) 它们的检测灵敏度。在 TripleTOF[®] 6600 系统上进行多肽的 LC-MS/MS 分析后, 使用 ProteinPilot[™] 软件的蛋白数据库搜索功能生成有关多肽序列、相对丰度和可能的翻译后修饰的更多详细信息 (图 1)。在食品加工或烘焙期间, 去除容易发生进一步反应 (如翻译后修饰、美拉德反应) 的多肽序列, 以改进所选多肽的列表。

对于每个过敏原, 选择两种唯一的蛋白质, 每种蛋白选择两种唯一的多肽, 每种多肽选择两个 MRM 离子对, 以确保可靠地鉴定过敏原。为在单次进样期间监控多个 MRM 离子对, 使用了 Scheduled MRM[™] 算法, 在个别 MRM 离子对的预期保留期间内, 会对其进行短时间的监控, 以减少循环期间并行的 MRM 实验总数, 同时保持循环时间和驻留时间。这种方法可最大化用于特征多肽检测的 S/N, 并且在鉴定新的过敏标记时扩展方法。

为鉴定同一食品样品中的多种过敏原, 总共表征了 88 个 MRM 离子对, 对应于鸡蛋、牛奶、花生、大豆和坚果中的 44 种过敏性多肽 (图 2)。在这 44 种多肽中, 40 个离子对对应于本底蛋白的具有唯一

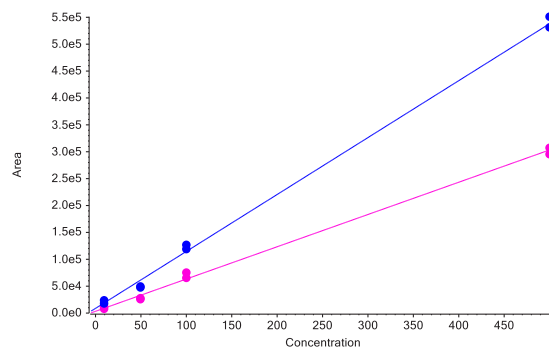


图3b. 花生多肽校准曲线 (0~500ppm)。同时检测两个 MRM 离子对, 第一个碎片离子对 (蓝色) 和第二个碎片离子对 (粉色)

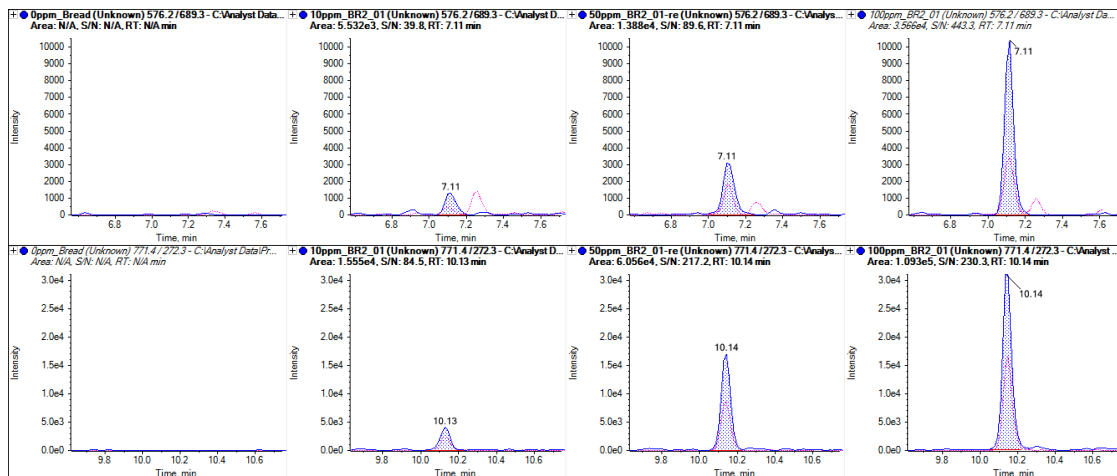


Figure 4. Extracted ion chromatograms for the signature peptide, protein 1 peptide 1, from hazelnut (top) and peanut (bottom). Varying concentrations of allergen (0, 10, 50 and 100 ppm) were added to bread samples. Two different MRM transitions for protein 1, peptide 1 are shown (blue, and pink traces).

序列的多肽。该 LC-MS/MS 的筛查方法同时检测了 5 种主要食品过敏原（鸡蛋、牛奶、花生、大豆和坚果）类别中的 12 种过敏性蛋白质，这些食品适用于浓度不同的烘焙产品。

不断提高的过敏在复杂的食品基质中，获得了高灵敏度的检测，特征性多肽的线性范围

(0~500ppm), 线性良好, 且校准曲线见图 3a 和 3b, 相关系数均大于 0.95。

所有过敏性多肽在检测时浓度低至 10 ppm (图 4), 并且生成的信号与添加的过敏原数量成正比。

LC-MS/MS 方法与基于 ELISA 的检测法相比, 优点之一是通过一次进样便可检测同一样品中的多种过敏原。在使用 LC-MS/MS 方法时, 为确保通量增大时仍然保持高标准性能, 直接对比了两种不同的过敏原检测方法。使用两个不同的 ELISA 试剂盒和基于 LC-MS/MS 的方法分析了所选过敏原(榛子和花生)的特征多肽。一般而言, 在 $r^2 \geq 0.99$ 时, 从 ELISA 与 LCMS/MS 获取的计算浓度之间具有良好的关联(图 5)。但是, 对于面包和饼干基质中添加榛子和花生的浓度, ELISA 方法测定结果有些偏差, 特别是在高浓度时。

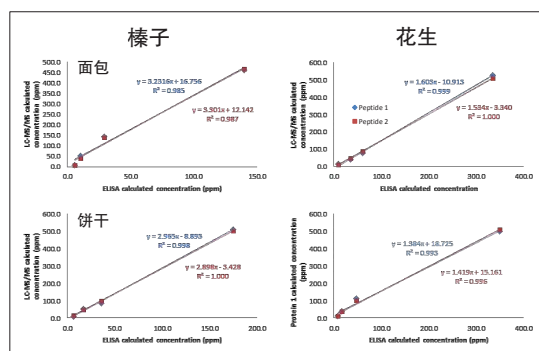


图5. 检测两种多肽(蓝色和橙色), 两种基质, 面包(上图)和饼干(下图), ELISA vs. LC-MS/MS方法检测过敏原的浓度对比。

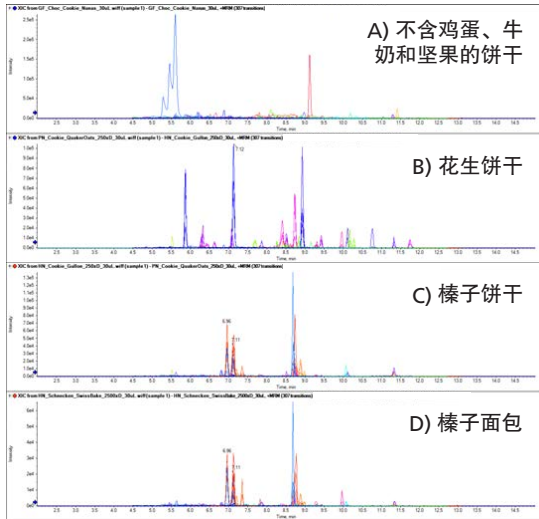


图 6. (A) 不含鸡蛋、牛奶和坚果的饼干, (B) 花生饼干, (C) 榛子饼干, 以及 (D) 榛子面包的提取离子色谱图。

为验证 LC-MS/MS 方法检测商业食品样品中过敏原的有效性, 使用特征多肽方法筛查了包含各种过敏原的烘焙产品 (饼干) (图 6)。在没有鸡蛋、牛奶和坚果的饼干样品中没有检测出过敏原相关信号。但在使用 LC-MS/MS 方法检测将榛子和花生列为成分的饼干和面包产品时, 结果呈阳性。还发现了其他过敏原, 包括鸡蛋和牛奶。

总结

我们开发了一种 LC-MS/MS 方法的多过敏原筛查方法, 这种方法可以通过鉴定对应于各过敏原唯

一特征多肽的多个 MRM 离子对, 并在单次进样中进行检测, 检测商业产品中的 12 种食品过敏原。总共有 88 个 MRM 离子对, 分别表示鸡蛋、牛奶、花生、大豆和坚果过敏原组分中的多肽。与 ELISA 方法不同, 此 LC-MS/MS 分析可以检测每种过敏性蛋白中的多种多肽, 从而提高方法特异性, 最大程度减少误报和漏报结果。只使用一种样品制备方法和多重数据采集, 便可筛查比之前报告的⁴更多的过敏原, 并且与烘焙的食品基质中包含的其他食品成分区分开来。

参考文献

- 1 R. Valenta et al.: 'Food allergies: the basics' Gastroenterology 148 (2015) 1120-1131
- 2 A. Sage: 'Food Allergen Analysis Using LC-MS-MS' LCGC The Column 10 (2015) 13-29
- 3 Codex Alimentarius Commission: 'Report of the Twenty- Second Session of the Codex Committee on Food Labelling' (1993), 下载地址: <http://www.codexalimentarius.org/>
- 4 S. Lock et al.: 'The Detection of Allergens in Bread and Pasta by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry' Application Note SCIEX (2010) #1830610-0

© 2016 AB Sciex. For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

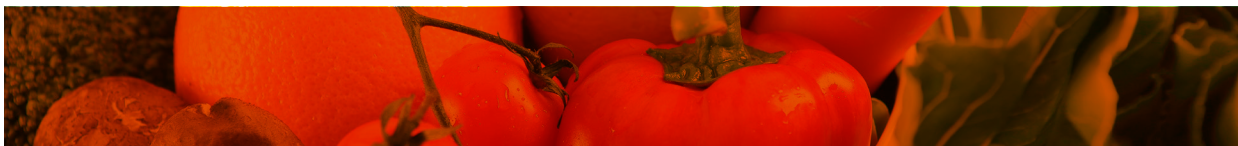
AB Sciex is doing business as SCIEX. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

Document number: RUO-MKT-02-2846-B



Headquarters
500 Old Connecticut Path | Framingham, MA 01701 USA
Phone 508-383-7700
sciex.com

International Sales
For our office locations please call the division headquarters or refer to our website at sciex.com/offices



利用 SCIEX QTRAP® 4500 系统建立假羊肉的检测方法

郭立海, 程海燕, 王海鉴, 靳文海, 刘华芬
SCIEX, 北京, 中国

引言

近年来, 已报道的市场上出售的部分羊肉卷中掺有大量的鸭肉, 甚至有老鼠肉, 商家通过掺假赚取非法利润, “挂羊头卖狗肉” 欺骗消费者, 侵犯消费者合法权益, 这种现象在中国已经是行业内潜规则。目前有效准确的检测方法特别有限, 只有个别检测机构利用聚合酶链式反应技术 (PCR) 扩增这些物种特有的DNA, 但这种方法并不能直接检测肉类的主要成分—蛋白质, 而且肉类处理加工过程会轻易地破坏和除掉这些DNA。这样一来, 就算食品样品中含有大量的鸭或老鼠组织和其他一些污染物都无法被检测到。还有一种补充方法—酶联免疫吸附法 (ELISA) 也可以进行蛋白质检测, 但是这种方法一次只能检测单个蛋白质, 不能一次实验同时检测多个物种, 反应特异性也不好。

肉类来源物种检测最大的困难是如何找到特定物种的特异蛋白质或肽, 由于以上两种方法特异性并不高, 可能会存在假阳性结果, 所以急需开发一种快速、准确和特异性更高的方法。

本文我们首先采用高灵敏度、高扫描速度的SCIEX TripleTOF® 5600质谱系统鉴定各肉类的蛋白质, 通过比较分析寻找各肉类物种蛋白质特异的肽, 经过blast进一步筛查和确认, 然后再在SCIEX QTRAP® 4500系统上利用MIDASTM工作流程建立起多重反应监测 (MRM) 检测假羊肉的方法。我们的目的就是建立一种简单易用的MRM检测假肉的方法, 不再需要复杂的方法开发过程, 而且该方法可以很方便的将新的需要检测的物种MRM离子对

加进去, 在一个方法里可以同时检测多个特征肽和多个物种。另外QTRAP®质谱可以利用MRM触发的增强离子扫描方式进一步确认蛋白质/肽序列, 从而可以有效的去除可能的假阳性, 增加检测结果的可靠性。最终我们的检测方法可以利用纯鸭肉或鸡肉样品来绘制标准曲线, 从而很容易计算出掺入假肉的比例和量。所以质谱检测方法要比PCR、ELISA或其他非直接检测方法更简单易用、更准确和更可靠。

方法

材料

本文所用的肉类样品鸭肉、鸡肉、羊肉、牛肉、猪肉、兔肉是从市场购买的, 掺假样品羊肉卷是从某大型超市购买, 大鼠肉来自实验用大鼠腿部肌肉。

样品制备

首先取2 g肉样均质, 加入液氮研磨成粉状, 然后加入蛋白提取液 (7 M 尿素, 2 M 硫脲, 4% CHAPS), 离心取0.1 mL上清液并转移到超滤管中, 加入二硫苏糖醇在60 °C条件下保持60分钟还原二硫键, 然后加入碘乙酰胺室温避光反应30分钟进行烷基化, 加入200 μL 50 mmol/mL碳酸氢铵溶液, 14,000 g离心20分钟, 重复3次, 最后加入100 μL含有胰蛋白酶的50 mmol/mL碳酸氢铵溶液震荡混匀, 40 °C酶解3小时。

特征肽的找寻

采用Eksigent nanoLC-Ultra®液相系统和SCIEX TripleTOF® 5600质谱系统鉴定各物种肉类蛋白质, 每



个样品上样2 μ g总蛋白。采用75 μ m内径柱子30分钟梯度分析时间。用ProteinPilot™软件进行蛋白质数据库检索，所用数据库是NCBI nr全库，选用了氨基酸替换搜索功能。

通过详细比较在各个物种肉类鉴定的蛋白质和肽列表，找到只在鸭肉或鸡肉样品里鉴定的特异肽，即这些肽可以作为鸭或鸡的特异标志物，且这些肽对应的蛋白质必须是几个物种里都能鉴定到的，只是肽的氨基酸序列有差别，并且尽量选用高丰度蛋白质对应的肽。最后将这些特征肽再在NCBI网站上进行blast分析，进一步确认其特异性，即这些肽的氨基酸序列不能与其他几个物种的100%匹配。

MIDAS™工作流程建立MRM检测方法

采用Shimadzu 20AD XR液相系统和SCIEX QTRAP® 4500质谱系统构建MIDAS™工作流程、建立MRM检测方法。每个肉类样品取2 μ g总蛋白，采用22分钟的液相梯度条件分离（表1），其中的A相为0.1%甲酸的水溶液，B相为0.1%甲酸的乙腈。色谱柱采用Phenomenex Kinetex 4.6 mm \times 100 mm, 2.6 μ m, 100A反向C18色谱柱，流速0.4 mL/min, 40 $^{\circ}$ C柱温。

MIDAS™工作流程

质谱检测是在配有电喷雾电离源（ESI）的SCIEX QTRAP® 4500质谱平台上完成的。MRM触发EPI方法是基于MIDAS™（见图1）工作流程开发完成。

基本思路是首先利用Skyline软件构建鸭和鸡的特征肽的MRM离子对和QTRAP®的MRM触发EPI实验方法。然后在7个肉类样品中逐一进行筛选和确认，根据同一个肽的MRM离子对的保留时间和MSMS质谱碎片离子与鉴定实验的匹配性去掉在其

表 1. MRM 检测液相分离条件

Time (min)	A (%)	B (%)
1	90	10
15	65	35
16	10	90
18	10	90
18.1	2	10
22	98	10

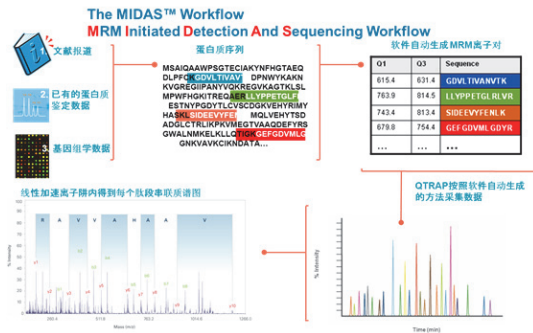


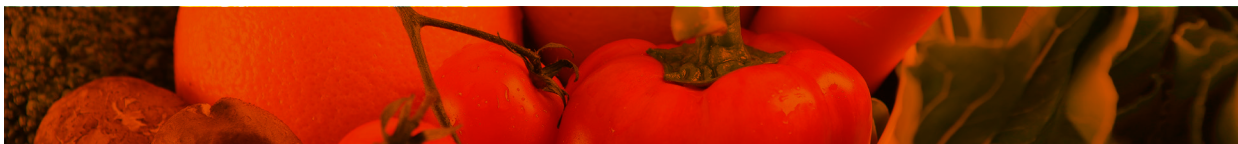
图1. MIDAS™工作流程。

他肉类出现的MRM离子对，保留特异的MRM离子对。并进一步优化DP、CE等质谱参数。

最终确定的质谱方法中，Turbo V™离子源参数为：gas1, gas2和气帘气为50psi，源温度设为350 $^{\circ}$ C，喷雾电压为5500V。采用Scheduled MRM™算法进行检测：MRM检测窗口设置为30秒，扫描时间设置为0.6秒。EPI扫描速度10000 Da/s，扫描质量范围：250-1200 Da，DP电压50 v，CE能量40 \pm 15 V。

掺入最低定量检测限LLOQ

将鸭肉和鸡肉蛋白样品按比例稀释加入到羊肉蛋白样品中，羊肉蛋白总量都维持在2 μ g，以此确定鸭肉和鸡肉掺入羊肉中的最低定量检测限。用MultiQuant™软件自动积分并绘制标准曲线并计算CV值和准确度。



结果

鸭和鸡特征肽找寻

肉类鉴定的方法开发最关键的是找寻某一物种特征肽，众所周知，一些物种亲缘关系比较接近，蛋白序列差别很小，比如鸡和鸭、羊和牛等。还有一些物种的蛋白数据库非常欠缺，比如鸭和羊，这样找寻这些物种特征肽还是有一定的难度的，所以我们采用TripleTOF®质谱系统和ProteinPilot™软件先鉴定这些物种肉样品包含的蛋白质，充分利用TripleTOF®质谱系统强大的蛋白质鉴定能力和ProteinPilot™软件优越的蛋白同源分析能力和物种分组能力。而且我们检索NCBI中所有物种的蛋白库，这样我们很容易在ProteinPilot™软件中确定一些物种同源的蛋白质和肽，并且比较容易地找到某物种特异的肽，即使鸭或羊的数据库不全，也可以通过ProteinPilot™软件氨基酸替换检索方式找到鸭的特征肽序列。最后在全的蛋白数据库NCBI网站做blast分析，进一步确认这些特征肽的物种特异性，将非特异的肽淘汰掉，保留特异肽。

我们从某大型超市里随机购买的羊肉卷里就鉴定出了大量的禽类来源的蛋白质，由于鸭蛋白质数据库不全，加上鸭和鸡亲缘关系比较接近，所以显示的蛋白来源物种基本是原鸡（见图2），这已经提示这些羊肉卷里确实掺入了某种禽类肉，但无法确定具体是掺入什么肉。但通过我们寻找的特征构建的MRM方法检测最终显示这些羊肉卷里主要掺入了鸭肉而非鸡肉（结果见图5）。这就提示MRM方法比蛋白鉴定方法结果特异性更好，所以最后我们决定开发MRM检测方法。

MIDAS™工作流程确认特征MRM离子对

SCIEX QTRAP®系列质谱最大的优势是将串联四级杆的高选择性MRM扫描和离子阱高灵敏度的碎片离子扫描即EPI组合在一起，从而可以实现

MIDAS™工作流程，这样MRM峰可以得到二级图谱的进一步确认，有效消除假阳性的MRM峰。比如我们就在用鸡的特征MRM方法分析兔肉样品时，在15.5分钟出现很明显的MRM峰，但其触发的二级图谱去做图库检索发现此MRM峰匹配到另外一个肽，并不是设定的鸡的特征肽，如图3。这说明单纯的MRM峰并不一定能判定兔肉中有鸡肉成分，需要MS/MS图谱进一步确认。

Protein ID				Species			
N	Unseqd	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptide(s)
5	59.66	59.66	44.4	gi11939947	PREDICTED: similar to myosin II (Gallus gallus)	Gallus gallus	871
11	62.66	107.26	43.7	gi11939947	PREDICTED: similar to Titin (Connectin) (Phallomyristic acid) (Gallus gallus)	Gallus gallus	86
10	44.26	44.26	48.9	gi14936498	M-protein, vitellin (Gallus gallus)	Gallus gallus	199
17	44.25	63.36	35.4	gi11939949	PREDICTED: similar to Titin (Connectin) (Phallomyristic acid) (Gallus gallus)	Gallus gallus	285
18	43.88	44.03	60.9	gi12602448	PREDICTED: troponin alpha-1 (Chamaeleon 2) (Menopon gallus)	Gallus gallus	36
19	43.67	43.67	78.1	gi11987227	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor (Gallus gallus)	Gallus gallus	277
20	36.36	73.43	43.2	gi11939949	PREDICTED: similar to Titin (Connectin) (Phallomyristic acid) (Gallus gallus)	Gallus gallus	673
32	28.99	28.99	68.4	gi0758110	PREDICTED: similar to Myosin heavy chain 2, TAD (Gallus gallus)	Gallus gallus	18
34	26.07	26.07	84.7	gi11989006	Myosin heavy chain 2, TAD (Gallus gallus)	Gallus gallus	148
36	25.05	74.95	68.1	gi11939949	PREDICTED: similar to Titin (Connectin) (Phallomyristic acid) (Gallus gallus)	Gallus gallus	861
38	24.12	24.12	38.8	gi134700728	6-phosphogluconase, muscle type (Gallus gallus)	Gallus gallus	201
44	21.58	21.58	46.2	gi114320089	vimentin (Gallus gallus)	Gallus gallus	144
47	20.96	43.97	29.9	gi11939949	PREDICTED: similar to connectin (Gallus gallus)	Gallus gallus	28
48	20.41	20.41	67.6	gi0484903	voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Gallus gallus)	Gallus gallus	12
60	19.16	19.16	57.1	gi11989006	phosphogluconase muscle 1 (Gallus gallus)	Gallus gallus	189
66	17.08	43.21	28.3	gi11939949	PREDICTED: similar to connectin (Gallus gallus)	Gallus gallus	36
67	16.28	37.81	73.0	gi14936498	ornithine decarboxylase (Gallus gallus)	Gallus gallus	46
68	16.10	16.10	44.3	gi17446414	ubiquitin-protein ligase E3 (Gallus gallus)	Gallus gallus	100
69	13.43	13.43	62.2	gi12602448	desmin (Gallus gallus)	Gallus gallus	121

图2. ProteinPilot软件显示超市购买羊肉卷里鉴定出大量禽类蛋白质。

鸭肉和鸡肉的最终特征MRM检测方法的确立

通过以上流程我们确定的鸭的特征MRM检测方法在纯鸡肉、纯羊肉、纯牛肉、纯猪肉、纯兔肉和纯大鼠肉样品中都没有检测到相应的MRM峰，在纯鸭肉样品中检测出强度很高的MRM峰，证明了该方法的专一性和可靠性，见图4。但在超市购买的羊肉卷里检测出很强的MRM峰，与在纯鸡肉里出现的MRM峰一致，证明此羊肉卷确实是掺入了鸭肉，是假羊肉卷，见图5。

通过以上流程我们确定的鸡的特征MRM检测方法在纯鸭肉、纯羊肉、纯牛肉、纯猪肉、纯兔肉和纯大鼠肉样品中都没有检测到相应的MRM峰，在纯鸭肉样品中检测出强度很高的MRM峰，证明了该方法的专一性和可靠性。同样在超市购买的假羊肉卷里没有检测到鸡的特征MRM峰，证明此羊肉卷里没

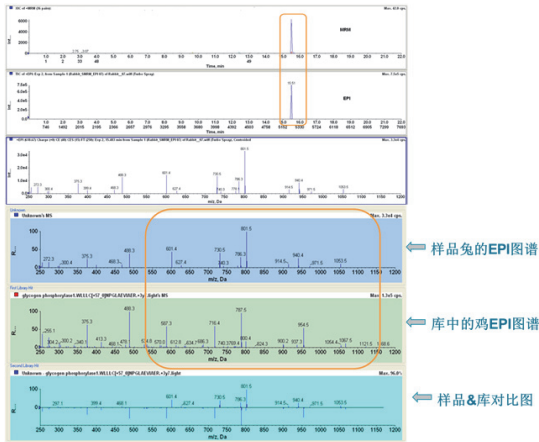


图3. 鸡的特征MRM方法在兔肉样品的MRM触发EPI数据。

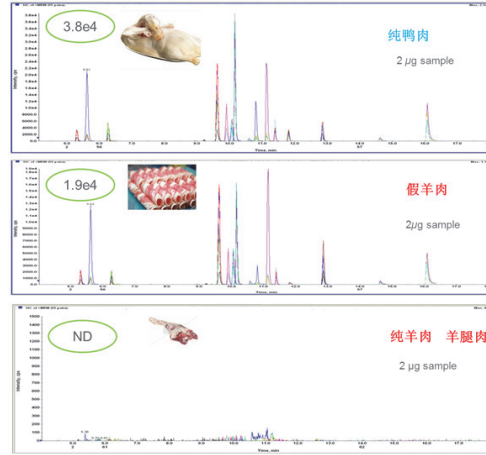


图5. 超市购买假羊肉卷里检测出很强的鸭特征MRM峰。

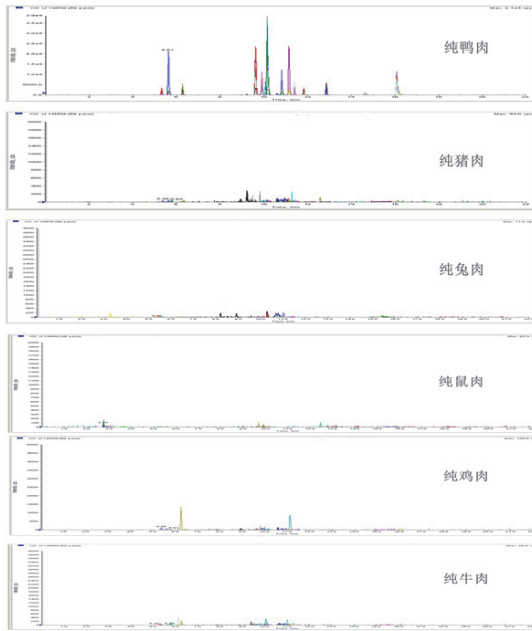


图4. 在其他样品里没有检测到鸭的特征MRM峰。

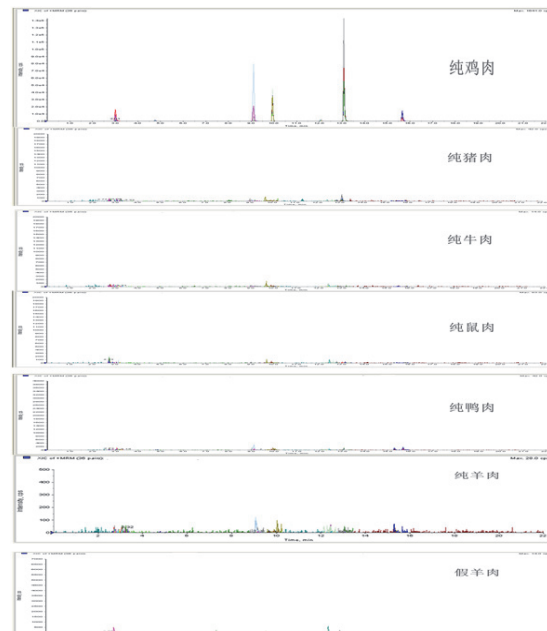


图6. 在其他样品里没有检测到鸡的特征MRM峰。



有掺入鸡肉。

羊肉中掺入鸭肉和鸡肉最低定量检测限

我们人为的将鸭肉和鸡肉蛋白按比例依次稀释加入到2 μg的羊肉蛋白里，用最终确定的鸭肉特征MRM方法和鸡肉特征MRM方法来确定最低定量检测限，鸭肉和鸡肉蛋白从2 μg开始掺入，每个稀释重复3次。最终确定鸭肉最低定量检测限可以达到4 ng，最低掺入比例为0.2%，从4 ng到2000 ng呈现良好的定量线性（见图7）。鸡肉最低定量检测限达到20 ng，最低掺入比例为1%，从20 ng到2000 ng呈现良好的定量线性，见图8。定量重现性良好，

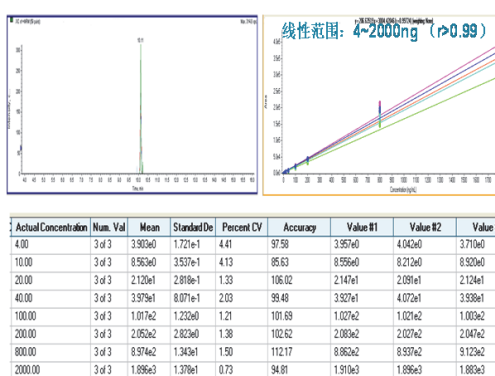


图7. 鸭肉掺入羊肉的最低定量检测限。

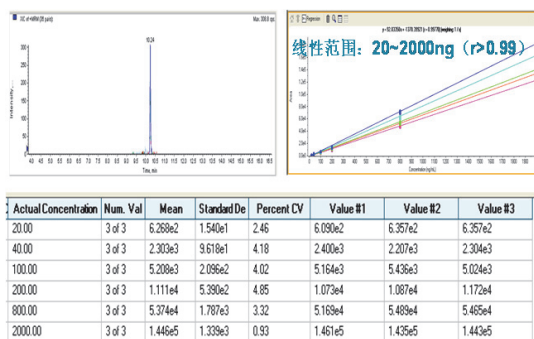


图8. 鸡肉掺入羊肉的最低定量检测限。

在最低浓度条件下，CV在5%以内。这样的最低定量检测限和最低掺入比例完全可以满足日常的肉类商检测的需要。并可以非常容易地以此标准曲线测得假羊肉里掺入鸭肉或鸡肉的比例和掺入的绝对量。

结论

液质联用技术为肉类物种来源检测提供了一种快速、稳定、灵敏、特异的方法。本方法的灵敏度可以媲美任何现有的ELISA方法或PCR方法。而且液质联用的方法可以同时检测多种生物物种，远远好于ELISA每次只能分别检测某种生物。使用MIDAS™工作流程可以在定量的同时，进行QTRAP®二级全扫描获得定性确认信息，与其他检测方式相比大大减少了假阳性的概率。

本文给出了肉类物种来源分析的一种通用流程，即用SCIEX TripleTOF®系列快速采集质谱系统和ProteinPilot™软件鉴定各个物种蛋白质，然后分析找到某些物种的特征肽，再进行blast分析筛选确定特征肽，然后转到SCIEX QTRAP®质谱系统上进行MIDAS™流程，确定最终的特征肽MRM检测方法。

本文建立了鸭肉和鸡肉物种来源检测的MRM方法，实验表明此方法具有很高的灵敏度、特异性、重现性和极低的线性定量检测限，并且在市场上出售的假羊肉卷样品中得到实际应用，表明此方法完全可以应用在日常的羊肉卷掺入鸭肉或鸡肉的实际检测中。最终可以通过绘制标准曲线很容易计算出在羊肉卷里掺入的鸭肉和鸡肉比例和绝对量。

本文建立的MRM检测方法简单易用，不需要再进行复杂繁琐的方法开发过程，可以直接用来检测羊肉中掺入的鸭肉和鸡肉，并且该方法具有很好的扩充性，可以很方便的加入新的需要监测的物种MRM离子对，一个方法里可以同时检测多个物种。



高分辨质谱 X500R 在保健品非法添加检测的应用

赵祥龙, 程海燕, 李立军, 靳文海
SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

保健品因其可以补充人体所需营养成分、修复部分亚健康状态, 越来越多的被人们使用。通常保健品是具备一种功效或者宣称功能的食品, 因此, 在日常使用中常被人们误认为具备一定的治疗效果, 从而与某些病症状态的恢复相联系; 为了凸显这些作用, 换取更大的经济利益, 许多不法商家在保健食品中添加有关药物以增加保健食品的功效。根据已报道及实际检验发现的案例, 保健食品中非法添加成分主要为功能对应的治疗药物、及药物副作用与功能对应的药物添加等选择方向, 在添加形式上, 存在一种或者多种药物添加、药物衍生物添加等。由于保健品中非法添加成分一般剂量较大、物质相互作用不确切, 因此对人体健康存在很大潜在危害性; 食药总局《保健食品中可能非法添加的物质名单》中明确规定对具有减肥、降糖、降压、抗疲劳、改善睡眠、提高免疫力等功效的6类保健品非法添加成分进行监测, 保障消费者健康。

基于 SCIEX 全新高分辨质谱 X500R 对保健品非法添加成分进行快速检测, 一针进样, 通过一级精确质量数和二级碎片谱图可对目前已报道的50多种非法添加药物进行定性确证; 在复杂基质中能够克服基质干扰, 特异性的对非法添加成分进行筛查, 使前处理更加简单方便; 全新的 SCIEX OS 软件将仪器控制、数据采集、数据处理等过程进行全方位整合, 工作流程更加直观、智能; 该方法的建立为保健品非法添加的高通量快速监测提供了一套有效的检测方案。

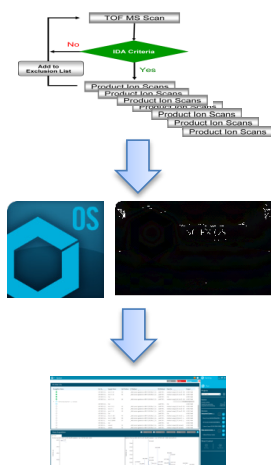
实验思路:

1. 收集目前市场上宣传有减肥、降糖、降压、抗疲劳、改善睡眠、提高免疫力等功效的6类保健品, 并进行简单前处理提取。
2. 以 TOF-IDA-13MS/MS 模式进行数据采集, 一针进样, 可有效获得目标物一级离子和二级碎片离子图谱。
3. 通过精确质量数、同位素分布、保留时间、标准谱库比对等四大关对样品进行阳性确证, 保证检测结果的准确性。
4. 检测报告, 对样品的筛查结果进行系统汇总, 报告内容可根据需求进行生成。

X500R 高分辨质谱筛查工作流程:

1. TOF-IDA-MS/MS数据采集同时获得TOF-MS和TOF-MS/MS
2. SCIEX OS软件进行数据分析, 确定阳性结果
3. 根据筛查结果及需求, 生成结果报告





正离子模式: A: 0.1% 甲酸水;
B: 0.1%甲酸乙腈;

负离子模式: A: 水; B: 乙腈;

流速: 0.3mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 10 μL;

质谱方法:

扫描方式: TOF-IDA-13MS/MS;

离子源: ESI 源

扫描范围: m/z 50-2000

CUR Gas: 30psi; 碰撞气 CAD: 7;

IS 电压: 5500V-4500V; 源温度: 600°C

雾化气 GAS1: 55psi; 辅助气 GAS2:70psi

DP 电压: ± 60 V 碰撞能量: 35 ± 15V

前处理方法

1. 将片剂碾磨成粉末, 胶囊取内颗粒, 液体样品均准确称取 1.0g 样品置于 10mL 离心管中;
2. 加入 5 mL 乙腈振荡 2 min;
3. 涡旋 2 min;
4. 在 4 °C, 10000 rpm 条件下离心 15 min;
5. 取上清液用稀释 1 倍;
6. 取过 0.22 μm 滤膜后直接进样检测;

液相条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18,
2.1 × 100 mm, 2.6 μm;

洗脱梯度:

Time (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
5.0	55	45
15.0	20	80
20.0	5	95
25.0	5	95
25.1	95	5
30	95	5

Source Parameter

- Source and Gas Parameters: In source gas 1: 95 psi, In source gas 2: 80 psi, Curtain gas: 30 psi, CAD gas: 7 psi, Temperature: 600 °C.

TOF-MS

- TOF MS: Polarity: Positive, Spray voltage: 5000 V, TCF start mass: 100 Da, TCF stop mass: 1000 Da, Accumulation time: 0.2 sec, Declustering potential: 80 V, Collision energy: 10 V, DP spread: 0 V, CE spread: 0 V.

IDA Criteria

- IDA Criteria: Small molecule, Maximum candidate ions: 14, Intensity threshold exceeds: 100, Dynamic background subtraction: checked, Exclude former candidate ions: unchecked.

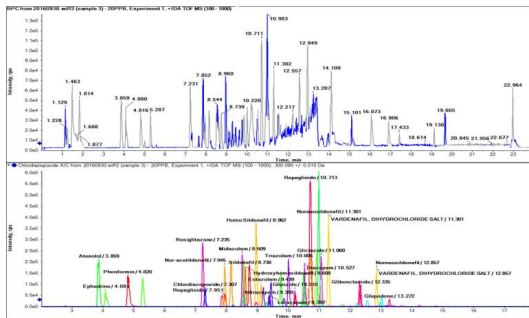
TOF-MS/MS

- TOF MS/MS: Precursor ion: 80 Da, TCF start mass: 50 Da, TCF stop mass: 1000 Da, Accumulation time: 0.05 sec, Declustering potential: 80 V, DP spread: 0 V, Collision energy: 35 V, CE spread: 15 V.

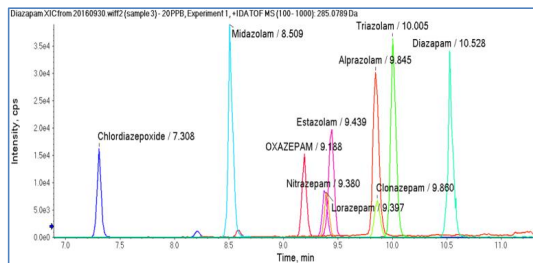


非法添加筛查方法建立：

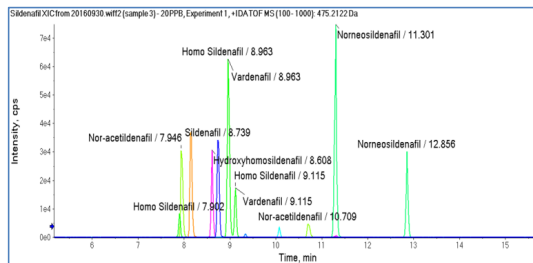
一针进样 50 多种非法添加药物同时监测：



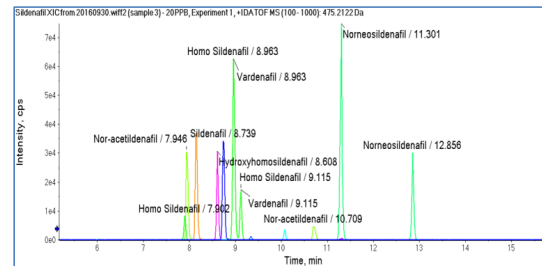
1. 10种镇静催眠药混标溶液（20ppb），提取离子流图（XIC）如图所示：



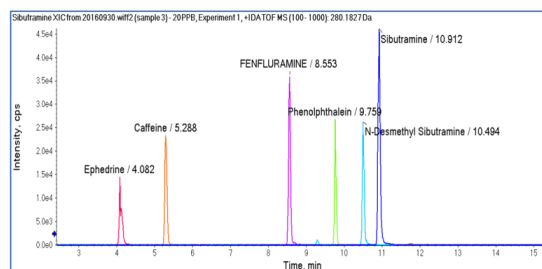
2. 7种降血糖类药物（浓度为20ppb），提取离子流图



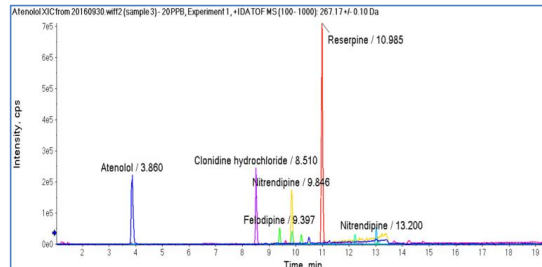
3. 8种壮阳类药物混标溶液（20ppb），提取离子流图



4. 6种减肥药混标溶液（20ppb），提取离子流图（XIC）如图所示：



5. 5种降压药混标溶液（20ppb），提取离子流图（XIC）如图所示：





样品信息：

根据食药总局《保健食品中可能非法添加的物质名单》随机选择了5类保健品进行筛查，涵盖减肥类、降糖类、降压类、抗疲劳类、改善睡眠及提高免疫力类等，共19个不同品牌来源样品；

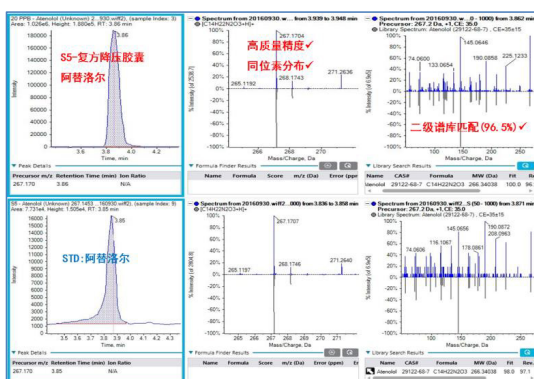
样品编号	样品类型	名称
Sample 1	助眠类	松果体安神
Sample 2	降糖类	糖脂安
Sample 3	降糖类	提取物降糖
Sample 4	抗疲劳类	原动力抗疲劳
Sample 5	降压类	复方降压胶囊
Sample 6	助眠类	安神补脑糖浆
Sample 7	降糖类	降糖中药
Sample 8	减肥类	瘦身胶囊
Sample 9	降压类	降压片
Sample 19

实验结果：

降压类：

1. 5号样品检出阿替洛尔呈阳性

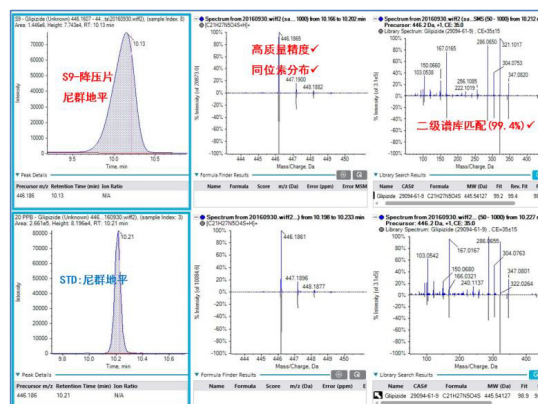
5号样品为某品牌降压胶囊保健品，宣称其起效速度快，坚持服用可有效控制血压。



5号样品经 X500R 筛查确证其非法添加较大剂量的阿替洛尔，长期大剂量服用阿替洛尔会导致严重的副作用，包括视力下降、呼吸困难、疲弱、抑郁症、不明原因皮疹及踝关节肿胀等各类症状。

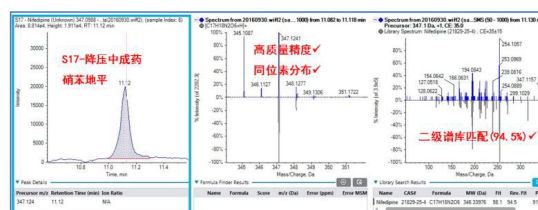
2. 9号样品检出尼群地平呈阳性

9号样品为某品牌降压片保健品，筛查结果显示其添加一定量尼群地平，其宣称纯天然提取物，无副作用，但部分长期服用尼群地平会导致出现过敏性肝炎、皮疹，甚至剥脱性皮炎等。



3. 17号样品检出硝苯地平呈阳性

17号样品为某品牌降压中药保健品，筛查结果显示其非法添加硝苯地平，以中药降压为噱头，虚假宣传其降压功效。



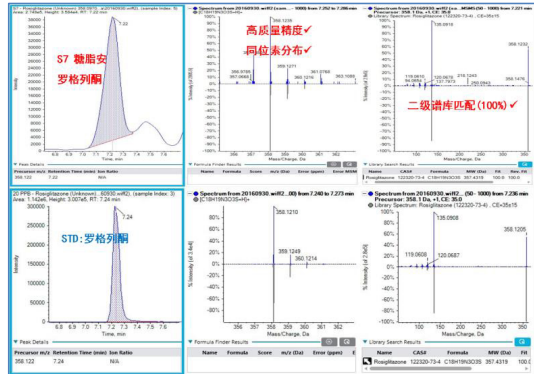
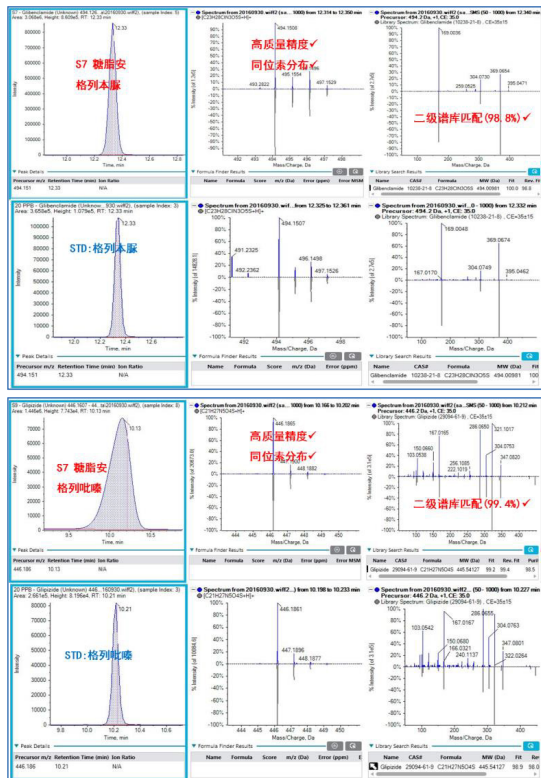


降压类保健品中没有标明剂量、适应症、禁忌症等，患者服用的随意性太大，不可能实现平稳降压，将对服用者的健康和生命造成威胁，尤其是对于多数高血压合并有心脏病、肾病、高血脂等病的患者。

降糖类：

1. 7号样品检出格列本脲、格列吡嗪、罗格列酮呈阳性

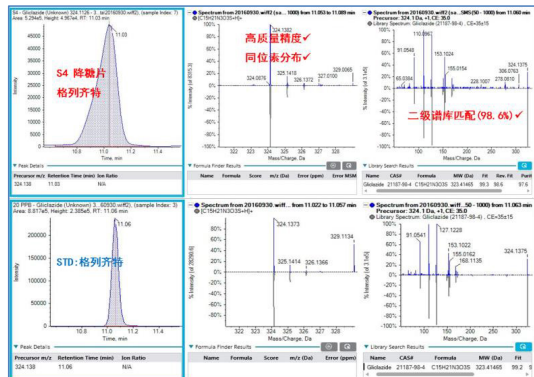
7号样品为某品牌降糖降脂类胶囊保健品，实验结果显示7号样品中含有格列本脲、格列吡嗪、罗格列酮等3种降糖类物质，格列本脲、格列吡嗪等磺脲类降糖药使用不当可能引起低血糖，少数病人会发生皮疹、多形性红斑、水肿，有一定的肝肾损害。



罗格列酮为噻唑烷二酮类降糖药，如果使用方法和剂量不当，会存在轻微上感，轻微头痛等症状。

2. 4号样品检出格列齐特呈阳性

4号样品为某品牌植物提取物，主要用于维持血糖稳定，筛查结果显示其非法添加格列齐特使其具有一定的降糖功效。



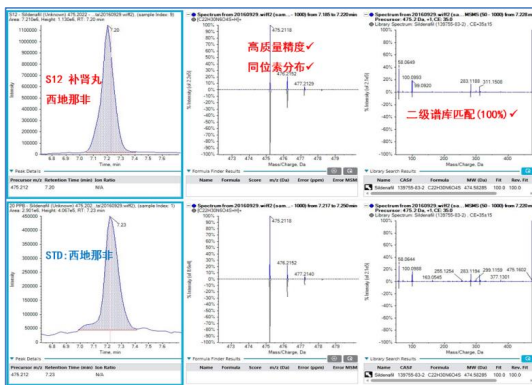
降糖类药物的原料药价格低廉，容易作为“功能成分”而被添加到降糖保健品中；这些化学药物都是用于医治糖尿病的常用药，降糖效果明显，但是副作用也较为明显，如果长期大量服用，最终会造成病人的低血糖和肾功能损害，甚至导致死亡。



抗疲劳 \ 壮阳类：

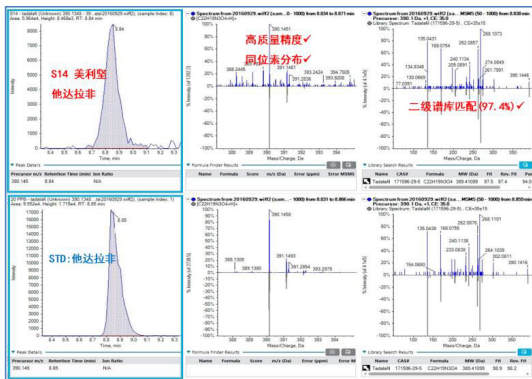
1. 12 号样品检出西地那非呈阳性

12号样品为针对中老年群体的补肾类保健品，产品介绍其为纯中药制剂，含有多味药材；筛查结果表明其非法添加大量的西地那非以实现其所谓的补肾功能。



2. 14 号样品检出他达拉非呈阳性

14 号样品为某品牌壮阳类保健品，壮阳类保健品是非法添加的重灾区，为了使起效时间快，添加成分一般剂量较大；筛查结果显示 14 号样品含有他达拉非。

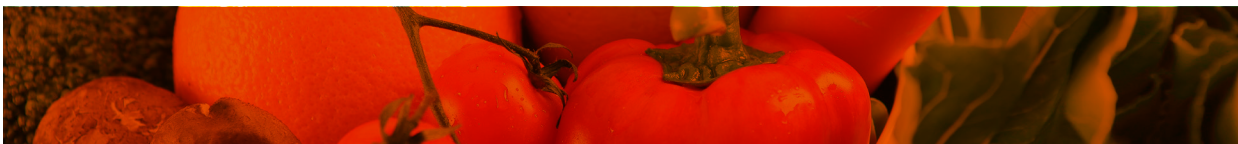


在没有专业医师指导下，长期大量服用这些非添加了“壮阳”药物成分的保健品，很可能对身体造成极大损害。若服用过量，极易引发毒副作用。会出现头晕、昏晕、甚至青光眼，造成对肾功能心脏功能、心血管疾病的严重损害。长期服用，还会导致食用者勃起不倒，伤及肌肉组织，甚至加重阳痿，甚至变为永久性阳痿。

筛查结果表格表明：

1. 保健品非法添加问题较为普遍，添加药物多样；
2. 降糖，降压类保健品非法添加种类多，添加形式以多种药物添加为主，尤其中药类较为严重
3. 抗疲劳，壮阳类保健品普遍添加剂量大；

样品编号	样品类型	阳性检出
Sample 1	松果体安神	-----
Sample 2	糖脂安	-----
Sample 3	动力抗疲劳	-----
Sample 4	提取物降糖原	格列齐特
Sample 5	复方降压胶囊	阿普洛尔
Sample 6	安神补脑糖浆	-----
Sample 7	降糖中药	格列吡嗪、罗格列酮、格列本脲
Sample 8	瘦身胶囊	-----
Sample 9	降压片	尼群地平
Sample 12	补肾丸	西地那非
Sample 14	壮阳片	他达拉非
Sample 17	中药降糖	硝苯地平



总结：

1. 本实验基于全新高分辨质谱 X500R 系统对 6 类保健品中 50 多种非法添加药物进行快速筛查，共检出 9 种非法添加药物呈阳性，包括西地那非，格列本脲、尼群地平等多种壮阳、降糖、降压类药物。
2. 一针进样同时获得一级精确质量数（TOF-MS）和二级碎片谱图（TOF-MS/MS），结合高质量的谱库，在复杂基质中能够克服基质干扰，对非法添加药物进行准确的定性筛查。
3. X500R 建立的非法添加筛查方法，以更加可靠、简单、快速的优势，为保健品非法添加筛查提供了一套高效的解决方案。
4. X500R 采用全新 OS 操作软件，让软件操作数据处理更加简单，快捷，直观。



X500R 在植物食用油中的真伪鉴别和产地溯源分析

杨总¹、龚蕊²、程海燕¹、李立军¹、郭立海¹
SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

引言

植物食用油是人体重要的营养来源之一，也是人体最重要的脂肪酸来源，在人体三大能量营养素中占有重要的地位^[1-3]。食用植物油不仅是人体细胞组织以及体内各种重要生理活性物质的构成成分，也是各种生物功能的载体。根据相关文献报道植物食用油中 95% 以上的成分为甘油三酯^[4]。由于甘油三酯的特殊的骨架结构决定了甘油三酯的营养价值，随甘油三酯骨架上脂肪酸种类的不同营养价值也各异。因此，对于植物食用油的真伪鉴别和溯源分析而言，甘油三酯的结构鉴定及组成分析可以提供更为准确、更直接的可靠依据。本文采用高效液相色谱串联新型高分辨质谱仪 X500R (图 2) 建立了常见的植物食用油的真伪鉴别和产地溯源的分析方法，对于植物油领域的打假和食用油的品质保证提供了有力的依据。

甘油三酯的结构示意图 (图 1)

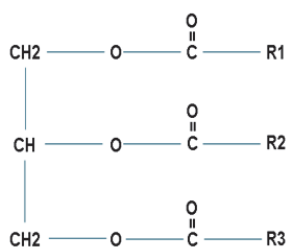


图1. 甘油三酯的骨架结构图，R1、R2、R3是三个脂肪酸链：Mono-Acyl-Glycerols 含有一个脂肪酸链 (MAG)，Di-Acyl-Glycerols 含有两个脂肪酸链 (DAG)，Tri-Acyl-Glycerols 含有三个脂肪酸链 (TAG)；

在食用植物油真伪鉴别和产地溯源分析遇到的困难和挑战

1. 取样很重要，样品必须要具有代表性，因此样品的类别和来源尤其重要；
2. 食用油样品基质复杂，共流出物多，对仪器设备的要求很高，质谱仪器必须具有超快的扫描速度，并且还需要同时兼顾分辨率、灵敏度、准确度等，才可以保证在分析过程中得到全面和有效的信息；
3. 由于该实验是针对食用油的真伪鉴别和产地溯源的研究，主要是体现在样品组与组之间的差异，即是食用油的食品组学研究。因此，对于组学的研究，样品数目往往会是几十个甚至几百个样品连续不断的进入质谱进行分析检测，样品采集需要数天，并且严格要求在采集过程中不能有任何的中断或间隔。于是组学研究对仪器设备的要求就势必越来越高，连续不断进样需要仪器拥有优异的稳定性和抗基质干扰的能力；
4. 由于食用油中主要是含有甘油酯类，诸多的脂质分子量一样，色谱行为一致，色谱分离差，对于脂质的研究，主要的困难和挑战是同重化合物和同分异构体；
5. 组学样品信息量庞大，需要专门的软件去快速发现样品组与组之间的规律，从而能够快速找出海量数据中的有意义的差异化合物；对于差异化合物的结构鉴定，需要更多的数据谱库，能够快速简便的进行谱库搜索进行鉴定分析；



图2. 新型高分辨质谱仪X500R;

本文实验方法的优势和特点

该实验采用高效液相色谱串联新型高分辨质谱X500R成功的应用于食用植物油的真伪鉴别和产地溯源分析, 并且很好的解决了植物食用油的真伪鉴别和产地溯源分析过程中遇到的诸多困难和挑战。该方法的优势和特点如下:

1. 样品收集: 实验过程中得到常见7种植物食用油: 分别是橄榄油、花生油、玉米油、葵花籽油、菜籽油、芝麻油、大豆油(图3);



图3. 7种常见的植物食用油。

2. 前处理: 样品前处理简便快捷, 采用甲醇/异丙醇(1/1, 5mM乙酸铵)进行直接稀释进样;
3. 样品采集: 最新型高分辨质谱X500R性能优异, 结合专利技术动态背景扣除(DBS)功能, 在拥有超快的扫描速度下(100Hz)同时兼顾高分辨、高灵敏、高准确度, 保证了仪器设备能采

集到样品中所有的有用信息, 同时也保证了采集数据的完整性和有效性; 本次实验连续进样采集了290个样品, 均进行正离子和负离子采集, 连续采样超过7天。每6个样品之间插入一个质控样品QC, 通过QC的数据表明尽管连续采集样品数天, 重复性依然良好, 表明该仪器具有超强的抗基质干扰能力和优异的稳定性;

4. 数据处理: 采用专门的脂质分析软件LipidView对样品中的脂质进行分析, 该软件含有数据库60余类, 约2.8万脂质物种, 大于600多种脂类特征碎片离子, 并且还不断的更新增加谱库的数据量, 数据处理操作简便快捷, 该软件完全满足脂质分析领域的需求; 为了更快更高效的找到组与组之间的规律, 本实验采用专门的组学分析软件MarkerView进行数据分析, 进行PCA和T-test分析, 快速找到具有代表性的脂类差异化合物, 其中包含了39种甘油酯类, 9种游离脂肪酸类; 采用最新数据分析软件SCIEX OS进行定量分析, 很快发现找到的标记物在各种油中量的变化规律;
5. 实验结果表明: 差异标记物39种甘油酯和9种游离脂肪酸能很好的鉴定常见7种植物食用油的真伪和溯源分析, 并且成功应用于橄榄油中掺杂葵花籽油的打假分析, 橄榄油和大豆油的产地溯源分析; 该实验结果在一定程度上对于植物食用油的真伪鉴别和打假、产地溯源分析具有重要的参考意义;

实验方法

液相条件:

液相: SCIEX ExionLC™ AC;

色谱柱: Phenomenex C18, 2.6μm,
2.1 × 100mm;



流动相：A 相为水 / 甲醇 / 乙腈 (3/1/1，含有 5 mM 乙酸铵)

B 相为异丙醇 (含有 5 mM 乙酸铵)；

流速：0.35 mL/min；

色谱柱温度：60 °C；

进样量：2 μ L；

进样器温度：15 °C；

洗脱程序：梯度洗脱；

质谱条件：

该实验采用最新型高分辨质谱 X500R 系统，采用 TOF MS-IDA-DBS-MS/MS 扫描方法，一针进样同时获得一级和二级信息；

离子源参数如表 1：

Table 1. Ion Source and MS Parameters.

Parameter	Setting
Curtain Gas (CUR)	35
Collision Gas	7
Ion Spray voltage (IS)	5500/-4500
Temperature (TEM)	600
Nebulizer Gas (GS1)	55
Heater Gas (GS2)	60
Declustering Potential (DP)	80
Collision energy (CE)	40
Spresd Collision energy(CES)	± 20
TOF MS Range (Da)	100 - 1000
TOF MS/MS (Da)	50 - 1000
DBS	On
Candidate TOF MS/MS Ions	12

结果与讨论

重复性和稳定性考察

本次实验总共运行了 290 个样品 (正离子 145 个，负离子 145 个)；每个样本各取一定量进行混合，制成 QC 样品。在进样过程中，每相隔 6 个样本，运行一个 QC 样品。实验取连续间隔 24 个样本采集的 QC 样品，取样本中不同时间段的分子量有差异的离子比较重复性差异。如图 4 所示，尽管仪器采集样品数天，三个不同保留时间的不同质荷比的离子可以重合，表明仪器的具有超强的抗基质干扰能力和优异的稳定性，保证了整批样品的可靠性。

X500R 拥有最快的扫描速度下(100Hz)，同时兼顾高分辨、高灵敏度、高准确度

X500R 具有最快的扫描速度，一针进样同时获得高分辨的一级和高分辨的二级质谱图；色谱峰仅 0.2min，依然可以采集到 15 个点，保证了定量的准

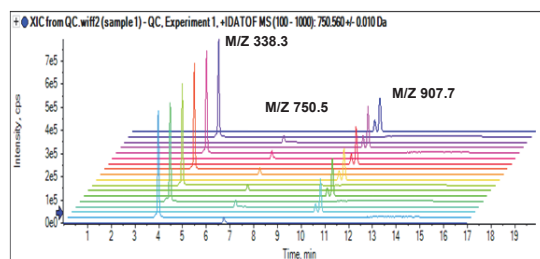


图4. QC样品的重复性考察；

确性；并且不管一级质谱图还是二级质谱图在全质量端分辨率 (R) 均在 3000 左右 (图 5)；连续 12 小时进样，质量误差在 1PPM 以内，具有超高的准确度 (图 6)；

专利技术 Dynamic Background Substract (DBS)

通过 DBS 功能能很好的去除背景离子的干扰，保证了整个色谱梯度采集到的二级质谱图有效和高质量；如图 7.1 所示，质荷比 149、205、471、601

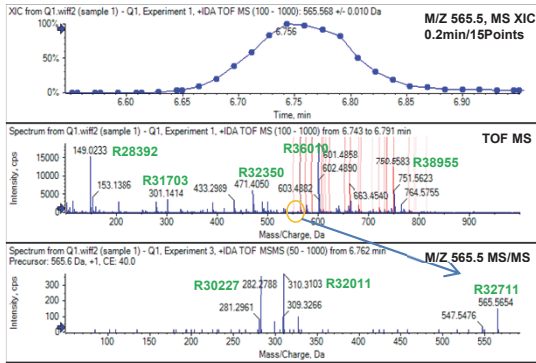


图5. 在超快的扫描速度下，兼顾分辨率、高灵敏度、高准确度；

Index	Sample Name	Component Name	Formula	Precursor Mass	Found At Mass	Expected RT	Mass Error...	Mass Error (pp...)
9	QC	TAG 52:1	C55H104O6	878.817	878.8179	10.40	✓	0.9
10	QC	TAG 52:2	C55H102O6	876.801	876.8008	10.39	✓	-0.8
11	QC	TAG 52:3	C55H100O6	874.786	874.7851	10.18	✓	-0.9
12	QC	TAG 52:4	C55H98O6	872.770	872.7698	9.95	✓	-0.4
13	QC	TAG 52:5	C55H96O6	870.755	870.7542	9.71	✓	-0.4
14	QC	TAG 52:6	C55H94O6	868.739	868.7394	9.48	✓	0.7

Index	Sample Name	Component Name	Formula	Precursor Mass	Found At Mass	Expected RT	Mass Error...	Mass Error (pp...)
1	QC	TAG 52:1	C55H104O6	878.817	878.8165	10.40	✓	-0.7
2	QC	TAG 52:2	C55H102O6	876.801	876.8014	10.39	✓	-0.1
3	QC	TAG 52:3	C55H100O6	874.786	874.7851	10.18	✓	-0.9
4	QC	TAG 52:4	C55H98O6	872.770	872.7694	9.95	✓	-0.9
5	QC	TAG 52:5	C55H96O6	870.755	870.7541	9.71	✓	-0.5
6	QC	TAG 52:6	C55H94O6	868.739	868.7393	9.48	✓	0.5

图6.连续12小时进样，质量误差在1PPM以内；

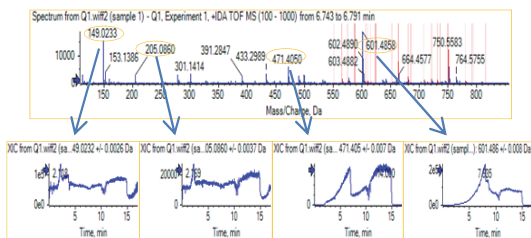


图7.1. 专利技术DBS功能；

虽然响应值很高，但是提取离子色谱图没有明显的色谱峰，因此不会打二级质谱图；然而对于有些丰

度较低的有意义的差异化合物，只要提取有明显的色谱峰，通过 DBS 功能依然可以采集高质量的二级质谱图（图 7.2），为化合物鉴定提供了很好的手段。

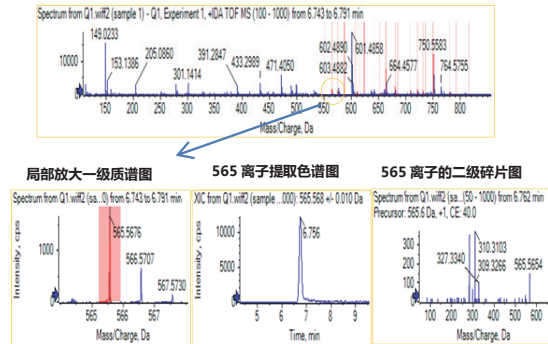


图7.2. 专利技术DBS功能；

样本中脂质的鉴定

根据国内外文献报道^[1-3]植物食用油中 95% 以上的成分为甘油三酯，含有少量的游离脂肪酸、磷脂、维生素、植物甾醇类激素等成分。该实验采用专门的脂质鉴定软件 LipidView 进行分析。实验结果表明主要成分是甘油三酯、甘油二酯以及游离脂肪酸。

脂质鉴定过程主要是根据保留时间的规律和二级碎片的规律，如图 7 所示，以甘油三酯 TAG 为例，双键越多，保留时间越靠前，并且每差一个双键，保留时间间隔相等（图 8）。甘油三酯的母离子加较峰比加氢峰响应值高，主要的碎片信息是母离子丢掉不同的脂肪酸链之后形成的，例如 TAG 52:3 主要是甘油三酯的骨架和三种不同的脂肪酸链组成（18:1/18:2/16:0）（图 9）。

游离脂肪酸没有特别明显的碎片峰，主要是通过保留时间谱库来进行定性分析，如图 10 中所以，游离脂肪酸 FFA 18:0、FFA 18:1、FFA 18:2、FFA 18:3 保留时间均相隔 0.2min，双键越多保留越靠前。

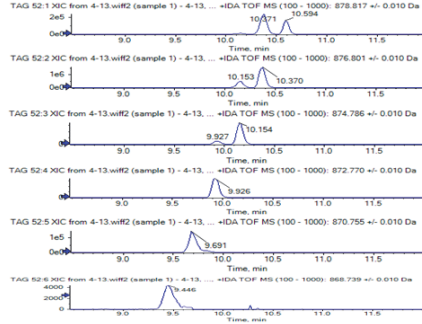


图8. 甘油三酯保留时间的规律;

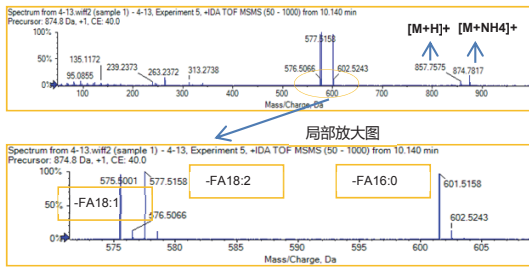


图9. TAG 52:3 (TAG 18:1/18:2/16:0) 甘油三酯碎片离子的规律;

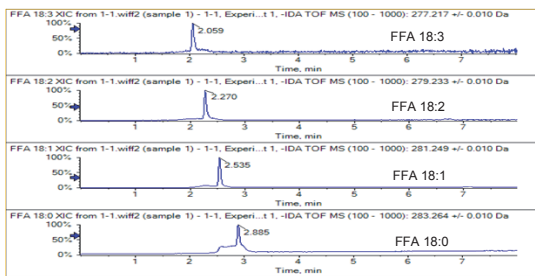


图10. 游离脂肪酸的保留规律;

7种植物食用油的真伪鉴别

数据处理思路 (图 11): 采用 Target 分析, 结合 LipidView 的鉴定结果, 主要是从植物油主要成分 TAG、DAG、FFA 进行有目标的分析; 采用

TAG 52:1

TAG 52:2

TAG 52:3

TAG 52:4

TAG 52:5

TAG 52:6

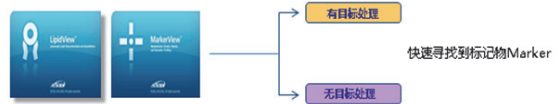


图11. 数据处理思路;

MarkerView 进行 PCA 和 T-test 快速准确找到差异标记物;

实验采用专门组学的分析软件 MarkerView 进行数据处理, 该软件操作简单快捷, 很快找到 7 种食用油之间的差异化合物。

针对甘油酯类, LipidView 软件鉴定出了 283 种甘油三酯和甘油二酯, 主要影响分组的两个维度因子 PC1 和 PC2 之和大于 75%, 并且为非监管的主成分分析 (PCA No-DA), 表明分组良好 (图 12); 针对于游离脂肪酸类, LipidView 软件鉴定出了 27 种游离脂肪酸, 主要影响分组的两个维度因子 PC1 和 PC2 之和大于 80%, 并且为非监管的主成分分析 (PCA No-DA), 表明分组良好 (图 13), 其中玉米油和葵花籽油差异不明显。

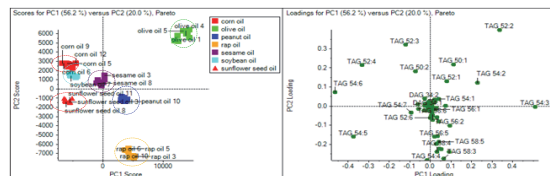


图12. 针对于甘油酯类化合物, 分组良好;

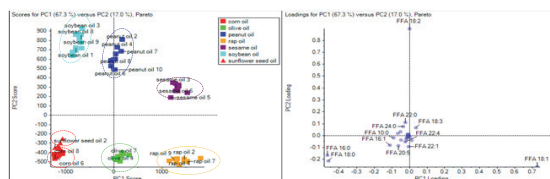


图13. 针对于游离脂肪酸类化合物, 分组良好;



实验采用 T-Test 检验，很快发现差异化合物在不同组样本间的变化规律，p-Value 值越小表明差异越明显（图 14）。本次实验总共发现有意义的差异化合物为 39 种甘油酯类、9 种游离脂肪酸类。

找到差异化合物之后，采用 SCIEX OS 进行定量分析，从量的层面进一步剖析差异标记物在 7 种植物油中含量的变化规律（图 15）。从实验结果可以看出，花生油和菜籽油与其他 5 种油的差异较为明显，主要表现在 TAG 56:3、TAG 56:4、TAG 56:5，TAG 58:3、TAG 58:4、TAG 58:5，TAG 60:3、TAG 60:4、TAG 60:5，表明这些甘油酯类可以作为鉴别这两类油的依据。

某些不法商为了谋取利益，会在较为昂贵的油品中掺杂一些便宜的油。该实验为了进一步验证找到的差异标记物是否能应用于日常食用油的真伪鉴别，实验采用了考核盲样进行测试。盲样来源于某植物油品牌生产制造商调制的调和油，其中主要是含有不同比例葵花籽油和橄榄油。实验结果显示：橄榄油和葵花籽油中标记物的响应值之和与调和油中标记物的响应值的比值接近 1（图 16），实验结果表明，找到的标记物可以作为鉴定葵花籽油和橄榄油配置的调和油，为保证消费者的利益提供了可靠的保证。

橄榄油和大豆油的产地溯源分析

搜集来自于不同国家和地区的橄榄油和大豆油。橄榄油的来源主要是意大利、希腊、西班牙；大豆油的来源主要是中国、巴西、美国。该实验对于产地溯源分析总共找到 34 个差异标记物。

由于地域和气候的差异，导致三个国家的橄榄油在甘油酯类和游离脂肪酸类有着很大差异。由图 17 显示，采用 No-DA 的主成分分析发现，甘油酯类的 PC1 与 PC2 之和大于 90%，游离脂肪酸的 PC1 与 PC2 之和大于 80%，表明分组良好。

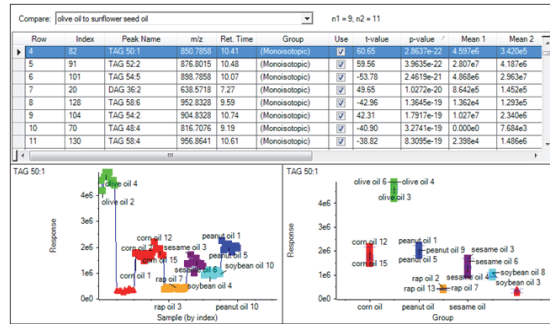


图 14. 通过 T-Test 检验，发现差异化合物；

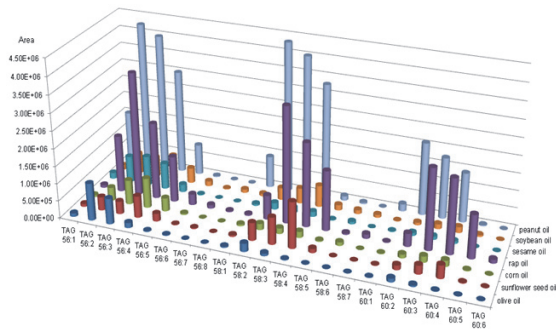


图 15. 部分差异标记物在 7 种油中变化规律 (n=10)；

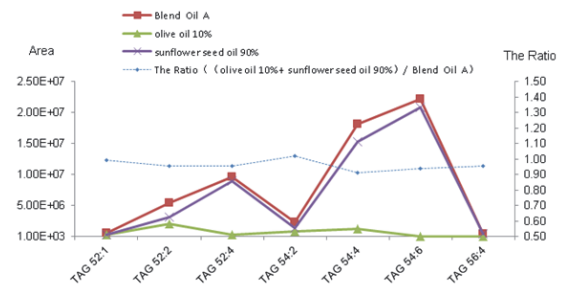


图 16. 调和油鉴定结果，该调和油为 90% 葵花籽油和 10% 的橄榄油组成（红色的线为调和油中标记物的响应值，绿色的线是橄榄油中标记物的响应值，紫色的线为葵花籽油中标记物的响应值；虚线为标记物在橄榄油和葵花籽油的响应值之和与调和油中标记物的响应值的比值）；

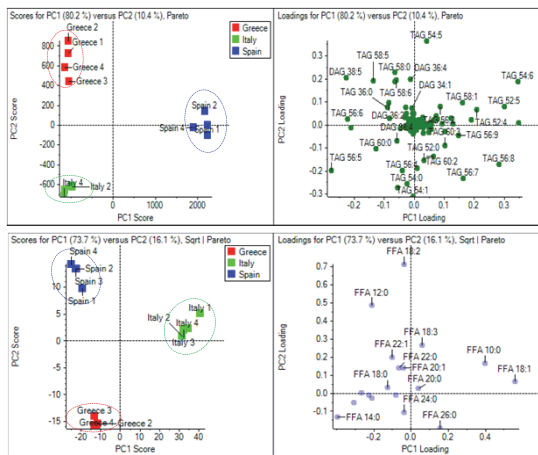
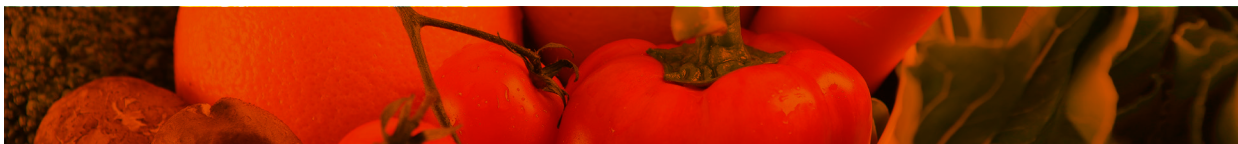


图17. 针对橄榄油，甘油酯类和游离脂肪酸，三个国家的分组；

对于大豆油而言，来自中国、巴西、美国三个国家的甘油三酯类分组较为明显，游离脂肪酸的分组不明显，通过 T-Test 检验确实发现游离脂肪酸在不同国家地区的浓度差异在同一个水平（图 18 和图 19）。

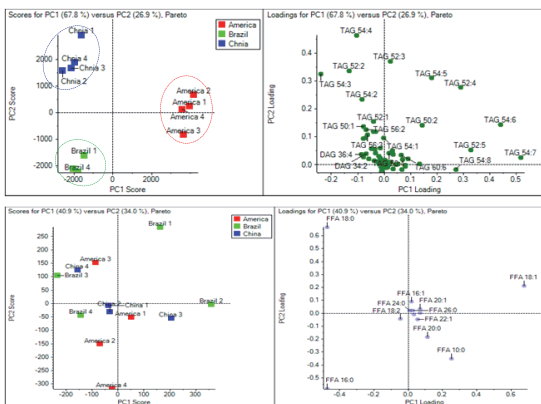


图18. 针对大豆油，甘油酯类和游离脂肪酸，三个国家的分组；

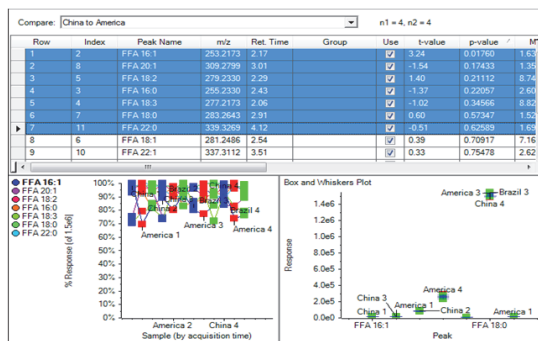
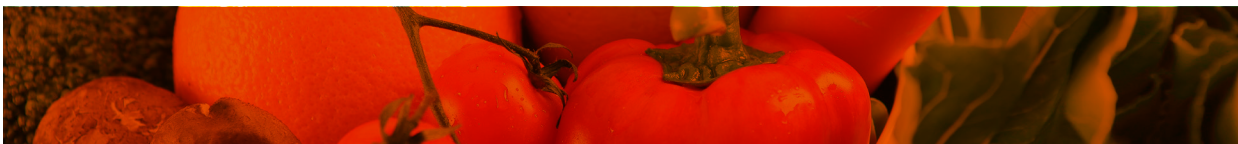


图19. 针对大豆油，T-Test检验发现游离脂肪酸在三个国家没有明显的差异；

总结

1. 本文通过高效液相色谱串联新型高分辨质谱 X500R成功的应用于食用植物油的真伪鉴别和产地溯源分析；本实验找到的39种脂类标记物和9种游离脂肪酸类化合物能成功的应用于植物食用油中的真伪鉴别和产地溯源分析；
2. 尽管植物油食用油基质复杂，共流出物多，X500R能够很好的解决该问题。X500R性能优异，结合专利技术动态背景扣除（DBS）功能，在拥有超快的扫描速度下（100Hz）同时兼顾高分辨、高灵敏、高准确度，保证了仪器设备能采集到样品中所有的有用信息，同时也保证了采集数据的完整性和有效性；
3. 通过质控样品QC的数据显示，尽管连续采集植物油样品数天，重复性依然良好，表明该仪器具有超强的抗基质干扰能力和优异的稳定性；
4. 专业的脂质分析数据库软件LipidView，包含了几万种脂种类，只需要搜索谱库就可以轻松完成脂质鉴定；专门的组学分析软件MarkView高效的完成主成分分析（PCA）和T - Test检验，



快速的找到标记物；将找到的标记物采用SCIEX OS软件可以简便快捷的进行定量分析，从量的水平进一步评估了差异化合物的在不同种类食用油中的变化规律；

参考文献

1. P. Georgios, S. Aristidis , F. Camin et al, Food authentication: techniques, trends & emerging approaches. Trends in Analytical Chemistry, 15, 2 - 41, 2016;
2. Fang Wei, Na Hu, Xin Lv, Hong Chen et al, Quantitation of triacylglycerols in edible oil by off-line comprehensive tow-dimensional liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using a single column. J. Chromatography A 1401, 60 - 71, 2015;
3. Serena Indelicato, David Bongiorno, Rosa Pitonzo, Vita Di Stefano, Valentina Calabrese, Sergio Indelicato, Giuseppe Avellone et al, Triacylglycerols in edible oil: Determination, characterization, quantitation, chemometric approach and evaluation of adulterations. J. Chromatography A 1515, 1 - 16, 2017;
4. Wahid Herchi, Faouzi Sakouhi, Sebei Khaled, Yeping Xiong, Sadok Boukhchina, Hbib Kallel, Jonathan M. Curtis et al, Characterisation of the glycerophospholipid fraction in flaxseed oil using liquid chromatography-mass spectrometry. J. Food Chemistry 129, 437 - 442, 2011;

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8425-ZH-A



高分辨质谱 X500R MRM^{HR} 对食品接触材料中 PFAS 类化合物的检测

王莎, 刘冰洁, 程海燕, 李立军, 靳文海
SCIEX, 亚太应用支持中心(北京), 中国

背景

全氟烷基类化合物(perfluorinated alkyl substances, PFAS)和其它表面活性剂类相比,具有稳定的物理和化学性质及疏油、疏水等特性,被广泛应用于工业生产和生活消费领域,包括与人们生活接触密切的食品塑料包装材料和粘锅等近千种产品。同时,PFAS在较强的理化作用下,经高等脊椎体内代谢而不发生降解,随着食物链的传递在有机生物体内不断聚积,能够诱发肝中毒、免疫疾病、内分泌干扰以及潜在的致癌风险^[1]。

近两年,随着我国外卖行业的急剧膨胀式发展,食品包装袋,餐盒及塑料薄膜等由于其强度、耐热性、稳定性高、且成本低廉,备受商家青睐^[2]。而另一方面,外卖餐盒垃圾所带来的环境污染问题已成为众矢之的。其中,对人体生命健康和环境污染危害较为严重的PFAS类化合物的监测也是迫在眉睫。

我国在最新的食品安全国家标准(GB 31604.35-2016)中对食品接触材料及制品PFOS和PFOA的测定做出具体规定,检出限为1.0 ng/g,定量限为2.0 ng/g。

2006年,欧盟会议通过决议,规定成品中全氟辛烷磺酸盐的量不允许超过产品质量的0.005%,这标志着欧盟已经全面禁止在商品中添加POFS类化合物。



X500R四级杆-飞行时间质谱系统,具有业界最快的扫描速度,较高的分辨率和独有的MRM^{HR}采集模式,不仅能够实现同三重四级杆同等的定量功能,同时所获取的高分辨二级离子将基质干扰概率降到最低,避免了由于假阳性所出现的“误判”现象,极大的提高了检测的专属性和灵敏度。Turbo V 离子源和气帘气锥孔接口专利技术以及离子源双喷雾技术、内置的自动校正体系实现了离子的稳定化,确保得到准确的高分辨质荷比。

在满足定量的基础上,又可以通过计算离子丰度比进行定性分析。

实验流程

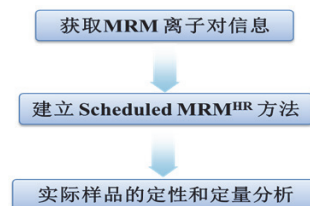


图1. Scheduled MRM^{HR}方法对PFAS化合物的定量流程。

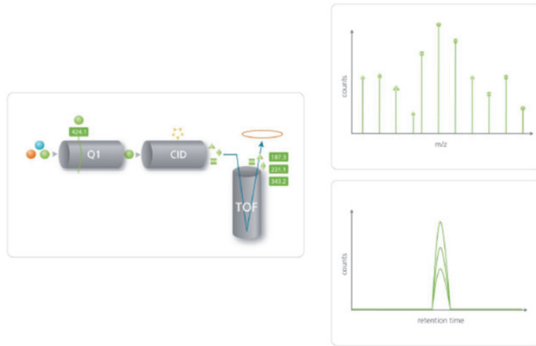


图2. MRM^{HR}原理示意图。

前处理方法

1. 试样准备

将待测的食品包装材料剪碎；涂层类：用小刀刮下。

2. 提取和净化

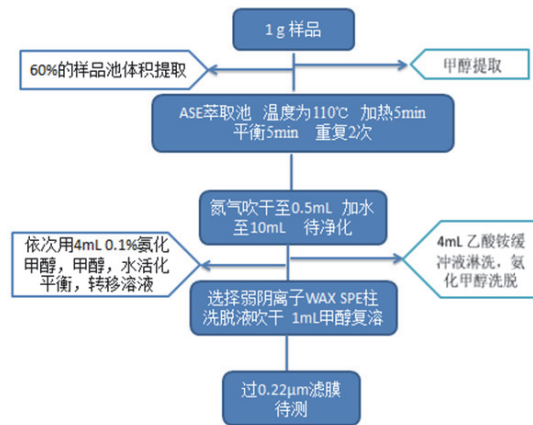


图3. 提取净化流程图。

以上前处理方法参考2017年4月19日实施的中华人民共和国国家标准（GB 31604.35-2016）；

本实验中共收集8个样品作为试样，包括：一次性餐盒、塑料袋、透明饮料瓶、不粘锅涂层等；

包装材质主要以聚乙烯、聚苯乙烯和聚四氟乙烯为主。

液相和质谱方法



液相条件：

色谱柱：Phenomenex Kinetex 2.6 μm C18 100 Å, 100 × 2.0 mm

流动相：A相为含5 mM NH₄AC水溶液；

B相为含5 mM NH₄AC甲醇；

流速：0.3 mL/min；

柱温：40 °C；

洗脱方式：梯度洗脱

质谱条件：

采集方法：Scheduled MRM^{HR}定量；

ESI离子源参数：

气帘气CUR：30 psi；

碰撞气CAD：7；

IS电压：-4500 V；

源温度：500 °C；

雾化气GAS1：50 psi；

辅助气GAS2：55 psi

MRM^{HR}定量方法建立

MRM^{HR}定量方法的建立过程能够完美体现SCIEX



OS软件全自动化、简单易学的特点。定量方法中MRM离子对可以通过两种不同方式导入，无论哪种方式都能大大降低时间成本，同时保证一针进样采集到稳定可靠、高质量的数据图谱。

直接利用已有的高分辨二级谱库将碎片离子导入至MRM^{HR}列表中，根据灵敏度的不同可以同时选择5个二级碎片离子信息，一键式操作，易于上手。对于谱库中没有的化合物，可以通过TOF MS-IDA-MS/MS 采集方式) 直接建库。

将现有的三重四级杆MRM离子对信息完全转移，包括每对离子所对应的保留时间，DP电压和碰撞能，如图4所示。

Compound ID	Group name	Precursor ion (Da)	Fragment ion (Da)	Accumulation time (sec)	Decustering potent...	Collision energy (V)	Retention
1	PFBA	272.90	158.9000	0.0000	-20	-11	3.22
2	PFpA	262.90	218.9000	0.0000	-20	-11	3.22
3	PFpA 2	69.0000	80.0000	0.0000	-55	-45	3.29
4	PFES	298.90	99.0000	0.0000	-55	-36	3.29
5	PFES 2	298.90	99.0000	0.0000	-55	-36	3.29
6	PFHxA	312.90	268.9000	0.0000	-25	-11	3.55
7	PFHxA 2	312.90	119.0000	0.0000	-25	-26	3.55
8	PFHpA	362.90	318.9000	0.0000	-25	-13	3.79
9	PFHpA 2	362.90	148.9000	0.0000	-25	-21	3.79
10	PFHxS	398.90	80.0000	0.0000	-40	-25	3.80
11	PFHxS 2	398.90	99.0000	0.0000	-40	-29	3.80
12	PFODA	412.90	368.9000	0.0000	-25	-15	4.08
13	PFODA 2	412.90	168.9000	0.0000	-25	-25	4.08
14	PFNA	462.90	418.9000	0.0000	-27	-14	4.48
15	PFNA 2	462.90	218.9000	0.0000	-25	-23	4.48

图4. Scheduled MRM^{HR}方法编辑示意图。

实验结果

在上述实验方法下，17种PFAS类化合物的TOF MS提取离子流图，如图5所示。

1. 高选择性的二级质谱定量

MRM^{HR}定量和TOF-MS定量相比，将基质对检测的影响降到最低，以在空白基质中添加0.2 ppb的PFHpA的信噪比为例（如图6）。

2. 良好的线性范围及准确度

17种PFAS类化合物都得到了相对较好的线性结

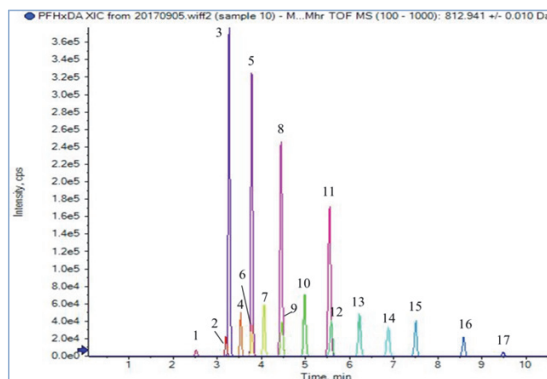


图5. 17种PFAS的TOF MS提取离子流图。

1, PFBA; 2, PFPeA; 3, PFBS; 4, PFHxA; 5, PFHxS; 6, PFHpA; 7, PFOA; 8, PFOS; 9, PFNA; 10, PFDA; 11, PFDS; 12, PFUDa; 13, PFDoA; 14, PFTTrDA; 15, PFTeDA; 16, PFHxDA; 17, PFODA;

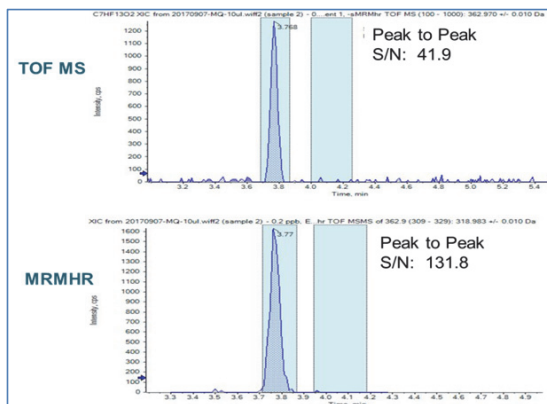


图6. PFHpA在TOF-MS和MRM^{HR}两种定量采集方式下的信噪比较图。

果，线性从0.05 ppb至20 ppb，线性关系和准确度良好（如图7所示），相关系数都在0.99以上，准确度数值在允许的偏差范围以内，并能够满足国标中对这类化合物检测和定量下限的要求。

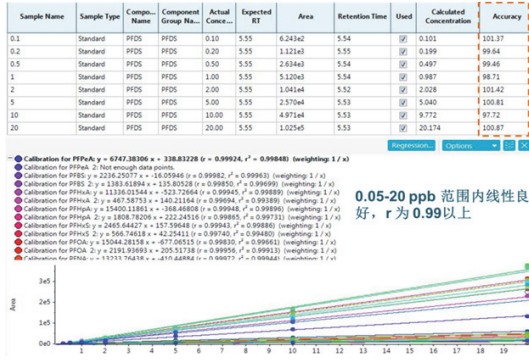


图7. 17种PFAS的线性图及PFDS的准确度。

3. 离子丰度比的计算

不同化合物的定性离子和定量离子丰度比也能够通过SCIEX OS软件平台直接进行计算并显示在结果列表中。另外，根据离子比值的大小，可以在Ion Ratios平台上按照标准要求进行方法设定，所测实际样品中化合物的Ratios比值就能够直观的反映在结果谱图中。图8为Ion Ratios两种不同的设定方法。

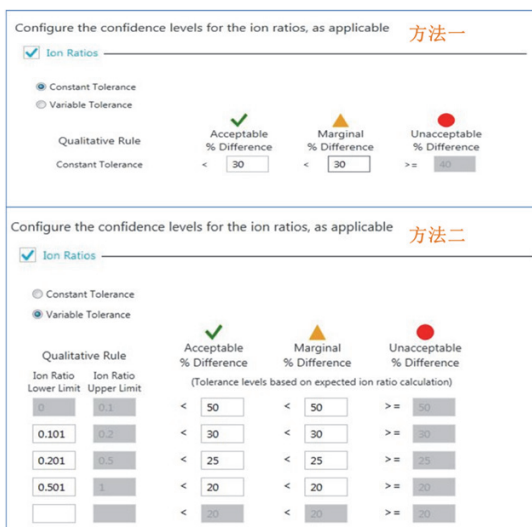


图8. Ion Ratios的两种不同方法设定。

4. 实际样品的检测结果

SCIEX OS软件的将定性和定量结果完美的结合在一起，具有数据处理简单，结果一目了然，简单易学等特点。如图9所示，结果列表显示包括该物质的保留时间，检出浓度，峰面积，Ion Ratio比值，以及所选择的一级母离子的质量偏差（0.9ppm）等相关信息。在实际样品的检出谱图中，定性和定量离子的比值也在方法所规定的允许偏差范围之内。

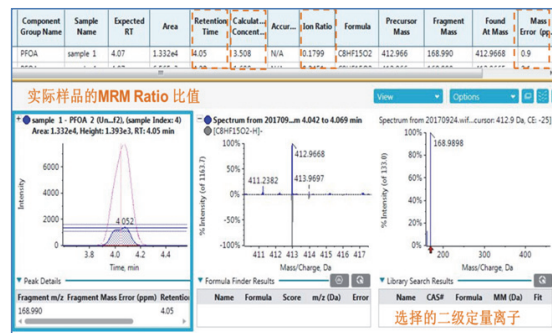


图9. 实际样品中PFOA的检出结果。

8个样品中，检出PFAS类共8类（表1），有7类超出国家标准规定的检出限要求，1类未超出检出限要求。检出的成分主要为全氟辛烷羧酸一类，主要集中在不粘锅涂层和一次性塑料餐盒。由于实际样品抽查量较少，不足以形成作为某一类样品是否能够安全使用的依据。



表1. 不同样品中PFAS的含量。

		Detected contents (ng/g)							
		PFHxA	PFHpA	PFOA	PFDA	PFuDA	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA
1	餐盒	0.14	0.16	3.15	-	-	-	-	-
2	餐盒	-	-	3.12	-	-	-	-	-
3	塑料袋	-	-	-	-	-	-	-	-
4	塑料袋	-	-	-	-	-	-	-	-
5	饮料瓶	-	-	-	-	-	-	-	-
6	饮料瓶	-	-	-	-	-	-	-	-
7	不粘锅	-	-	-	0.11	< LOQ	0.13	0.15	-
8	不粘锅	-	-	-	-	-	-	-	0.17

总结

X500R高分辨质谱结合独有的MRM^{HR}定量功能，通过获取的高分辨的子离子实现同时定量和定性分析。选择性和抗基质干扰能力强，极大的提高了检测的灵敏度，满足欧盟及国标的限量标准要求。

随机抽取的实际样品中，全氟类化合物的检出率相对较高，表明食品包装材料的质量和安全性确实存在一定的风险，影响到人们的健康。

参考文献

- [1] Xu R, Tan H, Yang H B, et al. Food and Fermentation Industries, 2014, 40(10): 205.
- [2] Kannan K, Tao L, Sinclair E, et al. Arch Environ Con Tox, 2005, 48:559
- [3] GB 31604.35-2016, 食品安全国家标准, 食品接触材料及制品 全氟辛烷磺酸 (PFOS) 和全氟辛酸 (PFOA) 的测定.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-7002-ZH-A

参考资料和链接

SCIEX 食品分析汇编 2018

访问网页获取更多的信息 sciex.com.cn/

SCIEX 寻求科学的答案, 探索生命的奥秘

搜索 国家/地区 登录

产品 技术 应用 诊断 教育 支持 活动 关于我们 获取信息

现在需要实现更精确的食品质量检测

LC-MS/MS 解决方案, 助力您实现食品合规目标

主页 > 应用 > 食品和饮料检测

端到端食品检测解决方案

食品检测实验室的成功和发展依赖于多种多样的质谱解决方案, 这些解决方案可以应对您所面临的一切问题。从残留物分析和真实性到食品安全、大麻和质量控制(QC), 拥有正确的仪器能够对财务业绩产生重大影响。那么, 如何才能保护食品检测实验室品牌并跟上当今全球的食品安全标准呢?

您的成功就是我们工作的动力 我们视为己任。

作为SCIEX的客户，您将得到世界一流的售后支持，无论在哪里，我们都将是您最为可靠的伙伴，为您解决难题，提供方案以及最大化提高工作效率。

我们的售后工程师提供全线LC/MS系统支持。无论您的离子源，自动进样器或者实际样品分析需要帮助，您都将得到及时反馈。我们将最大努力保证仪器的正常使用，帮助您完成科研工作。

我们的应用科学家提供可靠的工作流程，帮助您简化样品制备，减少人工操作步骤。帮助您开发方法以提高分析通量。通过提供简单易用的iMethod™方法，帮助您快速开展工作。我们也可以通过电话实现远程支持。

我们的资深专家为您量身订做适合您实验室的培训课程，提高工作效率。您可以到我们的Demo Lab参加LC/MS技术培训及应用课程，也可以通过网络 e-learning工具进行学习。

我们的售后支持团队随时为您提供最新产品信息，软件更新，分析方法及仪器维护，确保您在竞争中独占鳌头。

我们将竭尽所能为您提供高效优质的服务。

更多信息，请访问：www.sciex.com.cn
www.sciex.com



SCIEX
官方微信



SCIEX
客户服务



SCIEX
毛细管电泳

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2018. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-03-8250-ZH-B



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-24197200
传真：021-24197333

广州分公司
地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-85100200
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897 网址：sciex.com.cn 微博：[@SCIEX](https://weibo.com/SCIEX)
SCIEXNow™服务热线：800 820 3488, 400 821 3897 服务邮箱：Service.china@sciex.com