

高分辨质谱X500R全面分析柑橘农残、成分及种属差异

High Resolution Mass Spectrometry X500R Comprehensive Analysis of Citrus Pesticide Residues, Components and Species Differences

焦必宁¹, 张耀海¹, 赵其阳¹, 陈晓辉², 徐晓燕², 龙志敏², 郭立海²

¹中国农业科学院柑桔研究所(重庆), 中国; ²SCIEX China

Key Words: Citrus, X500R, Components, Pesticide

引言

柑橘是世界上第一大水果, 第四大贸易农产品, 在世界水果产业中占有重要地位。中国农业科学院柑桔研究所是唯一的国家级柑桔专业科研机构, 主要致力于柑橘质量质量安全与标准研究, 选育优良配种, 病虫害防控, 有效成分分析, 种质资源评价等。

如何控制柑橘质量, 分析果皮果肉中农残, 全面分析柑橘有效成分, 比较不同品种农残和有效成分差异选出优质品种, 能否快速全面的分析柑橘质量与种质, 是一个难题。随着液相色谱质谱联用技术的不断发展和普及, 越来越多的小分子化合物检测技术基于LC-MS/MS系统进行开发。如何利用液质联用技术全面研究橘属成分, 进行质量控制与物种溯源, 是一个亟待解决的难题。

高分辨质谱X500R全新的硬件设计, 包括N-型离子路径技术、飞行时间管恒温设计以及稳定耐用的Turbo V™离子源等, 保证了X500R长时间在常规检测实验室环境下检测的样品拥有更高的质量稳定性和可靠性。X500R高灵敏度的高分辨分析和准确质荷比定性分析, 结合智能化的TOF MS-IDA-MS/MS采集模式, 可真正实现一针进样即可采集到高质量的一级与二级质谱数据, 快速高效的提供最准确地定性定量分析结果。

SCIEX ExionLC™ 液相系统SCIEX X500R QTOF 质谱系统 SCIEX OS 工作站



实验设计:

- 1、分析不同提取条件(甲醇, 甲醇:DMSO1:1, 水)、不同取样部位(果皮, 果肉)、不同品种(黄果柑, 不知火)差异成分与农残差异
- 2、通过TOF-IDA-MS/MS模式采集数据, 可以实现一针进样, 同时采集不同组分化合物的一级母离子和二级子离子。
- 3、通过MarkerView™统计分析软件, 建立模型, 分析差异成分, 找出有统计学意义的差异组分, 进行质量控制与物种溯源。
- 4、通过SCIEX OS软件得到高质量的一级母离子和二级子离子质谱数据后, 与SCIEX公司专业农残及有效成分高分辨MS/MS数据库或ChemSpider在线数据库进行匹配, 对农残、有效成分和差异成分进行定性。

实验设计流程:



材料与方法

本试验收集了黄果柑果皮、黄果柑果肉，不知火果肉，干燥，粉碎机粉碎，过20目筛，至于干燥器中，备用。

前处理方法

精密称取称取0.5 g样品3份，分别加甲醇，甲醇:DMSO 1:1，水，5 ml，超声30 min，高速离心12000 g，取上清进样分析

色谱条件

液相：ExionLC™ AD

色谱柱：Waters HSS T3 column(150 × 2.1mm, 3μm)

流动相：A相Water(含2 mM NH₄FA+0.05%FA)；

B相 CH₃CN:CH₃OH 1:1

采用梯度洗脱，如下所示

Time (min)	A%	B%
0.0	97	3
2.0	97	3
24.0	20	80
26.0	2	98
30.0	2	98
30.1	97	3
35	97	3

流速：0.3 mL/min；柱温：40℃；

进样量：1 μL

质谱方法：

质谱仪：SCIEX X500R QTOF

扫描方式：TOF -IDA-MS/MS

离子源：ESI源

CDS自动校正系统

离子源参数

IS: 5500 V/-4500 V

CUR: 35 psi

GaS1: 60 psi

GaS2: 60 psi

TEM: 550 °C

CAD: 7

CE: 40V

DP: 80V

CES: 20V

质谱参数设置一目了然：

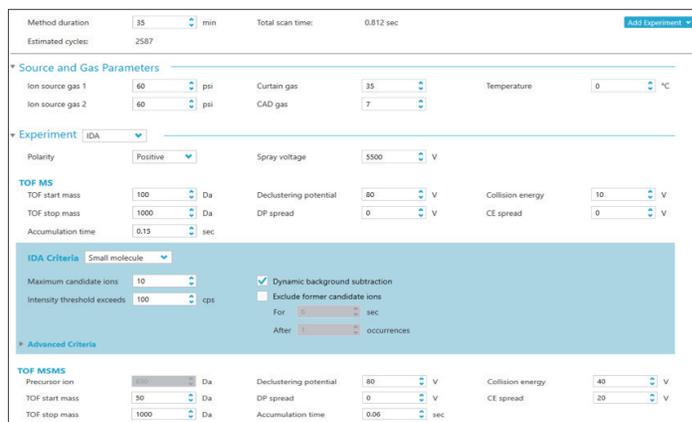


图1. TOF MS-IDA-TOF MSMS方法编辑。

色谱图：

柑橘不同品种，不同取样部位、不同提取溶剂的总离子流图（TIC），如下图2所示：

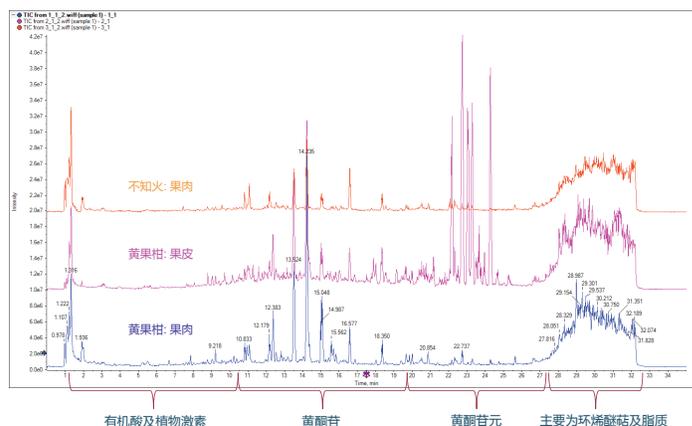


图2-1. 不同取样部位总离子流图，果皮中22-25min黄酮类苷元含量高。

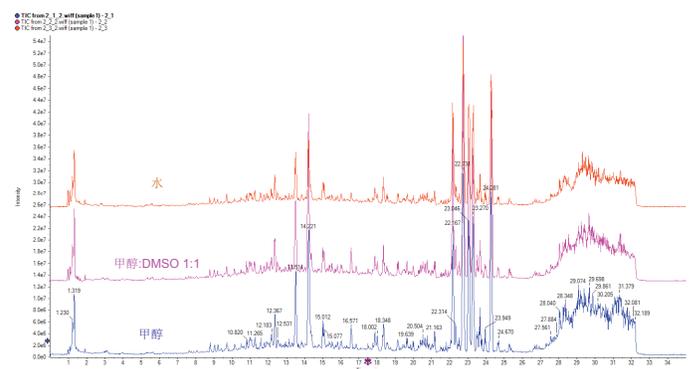


图2-2. 不同提取溶剂对比：黄果柑果皮水、甲醇:DMSO 1:1、甲醇提取效果：基本一致。

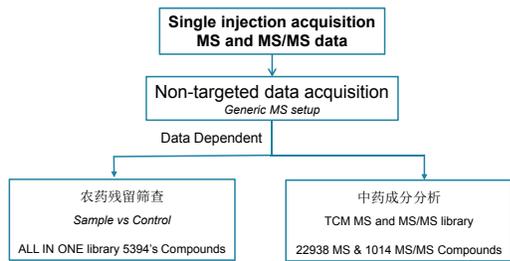


图3. 数据分析策略。

定性定量分析结果

SCIEX OS软件系统平台，同时提供质谱仪控制、方法编辑、数据分析、结果报告。

1. 农药残留筛查

利用SCIEX OS软件导入农残谱库，设置定量积分参数，设置谱库检索条件，设置筛查置信条件，一次性导入样品进行筛查，通过Mass error、RT、Isotope、Library过滤结果，得到每个样品的筛查结果。

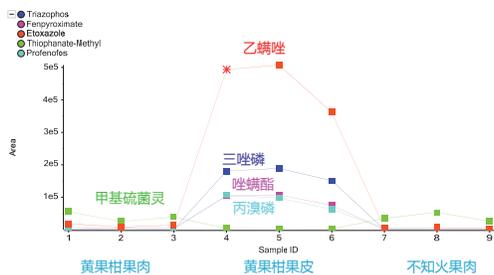


图4. 5种橘类常用农药在3种样品3种不同提取溶剂含量变化。

这5种均为橘常用农药，据文献：“三唑磷在柑橘和土壤中残留行为的研究中”：三唑磷在橘园中的残留量分布为：柑橘果>>柑橘园土壤>>柑橘果肉，表现出明显的接触性残留规律。

2. 橘属有效成分筛查

利用SCIEX OS软件建立橘属有效成分列表，同时检索TCM MS/MS谱库，设置定量积分参数，设置谱库检索条件，设置筛查置信条件，一次性导入样品进行筛查，通过Mass error、RT、Isotope、Library过滤结果，得到每个样品的筛查结果及定量信息（图5）。

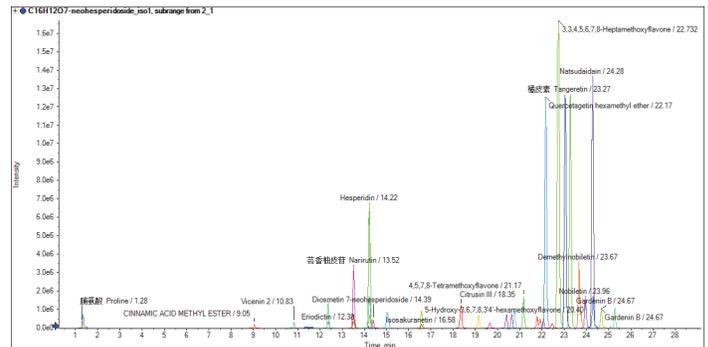


图5. 黄果柑果皮部分有效成分提取离子流图。

3. 特征性成分数据提取

利用SCIEX OS软件Explore—Process—Fragment and neutral Loss Filter，输入黄酮的特征碎片及黄酮苷的特征中性丢失，多个Fragment只要存在一个即可被提取出来，通过过滤可以快速提取黄酮及黄酮苷类化合物（图6）。

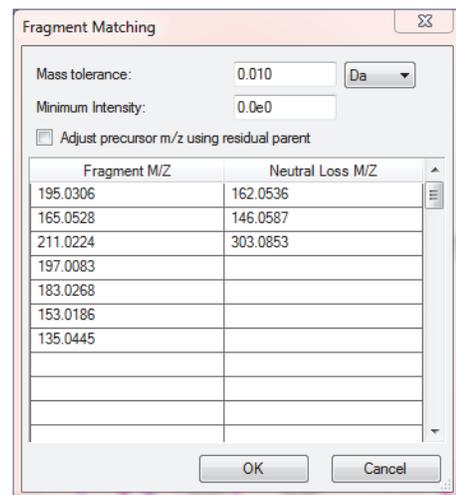


图6. Fragment and neutral Loss Filter。

4. MMDF快速分析目标成分

利用SCIEX OS软件Explore—Process—Mass Defect Filtering，输入橙皮苷分子式C₂₈H₃₄O₁₅，质量亏损40 mDa，过滤质荷比范围为500-700Da，快速找到一系列与橙皮苷结构相近的黄酮苷（图7）。

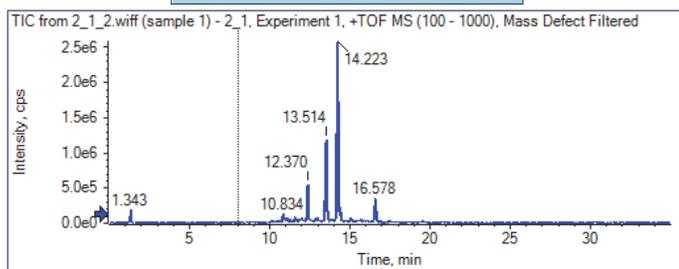
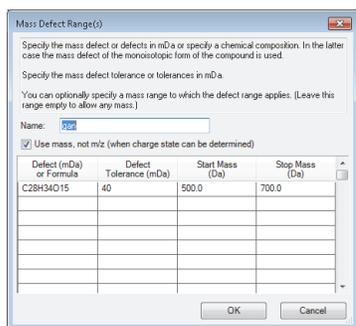


图7. Mass Defect Filtering设置及过滤后TIC。

5. 统计分析软件MarkerView™: 分析黄果柑果肉, 果皮与不知火果肉PCA分析

将原始数据导入MarkerView, 进行特征分提取, 保留时间对齐, 峰面积积分等, 分组, 进行无监督性地PCA分析, 得到其Score和Loading图见图8。从图中可以看出, 黄果柑果肉, 果皮与不知火果肉成分差异明显, 尤其是果肉与果皮特征成分不同 (Score Plot PC1 76.5%, PC2 12.5%)。从Loading Plot看出果肉 $m/z > 500$ 的黄酮苷含量高, 果皮 $m/z < 450$ 的黄酮苷元含量高。组内差异是由不同提取溶剂导致的。Markerview同时可以使用T-test分析, 快速找到组间响应差异大的差异质荷比, 如果差异质荷比在橘属成分列表与本地数据库中均未找到, 可以利用OS内置

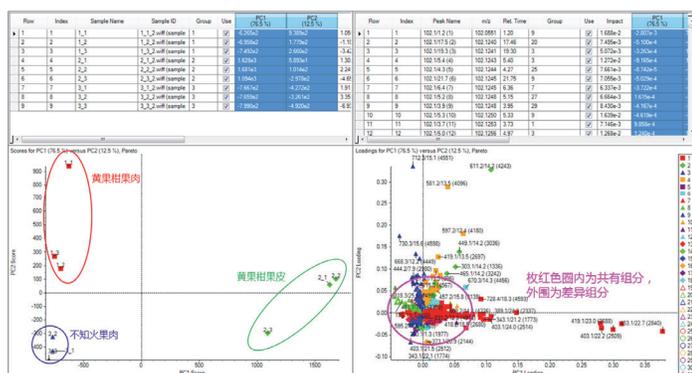


图8. 黄果柑果肉, 果皮与不知火果肉PCA分析结果 (左下图为Score Plot, 右下图为Loading Plot)。

ChemSpider在线数据库进行结构推测, 若在线数据库中也未发现, 可以利用与已知结构相关性进行结构鉴定, 发现新的成分。

6. 实验小结

SCIEX X500R QTOF高分辨质谱仪, 对黄果柑果肉, 果皮与不知火果肉的提取条件, 特征成分与种属关系进行了分析, 一针进样, 强大的信息依赖 (IDA) 采集功能, 获得高分辨的TOF MS和TOF MS/MS图, 结合SCIEX公司专业的农残及中药成分高分辨MS/MS数据库, 软件自动计算理论分子量、同位素分布、并同时和谱库中的MS/MS进行匹配, 通过综合得分, 能直观、快速、准确地得到柑橘农残及成分鉴定结果。配合组学分析软件 MarkerView™, 建立模型, 分析不同提取条件 (甲醇, 甲醇:DMSO1:1, 水)、不同取样部位 (果皮, 果肉)、不同品种 (黄果柑, 不知火) 差异成分, 进行质量控制与物种溯源。全面揭示了农残, 有效成分, 不同提取条件, 不同来源, 不同取样部位对柑橘质量的影响, 为柑橘质量评价提供了一种全新的探索思路。

总结

本实验展示了X500R高分辨率液质联用系统在植物成分鉴定领域的优势, 获得高分辨率的质谱数据 (TOF-MS和TOF-MS/MS), 能够提供高效快捷一体化的解决方案, 为客户的植物成分鉴定研究提供强有力数据支持。该方法的主要技术特点如下:

1. SCIEX OS是集合数据采集和数据分析的综合性软件, 可以实现数据采集和处理的简单化的操作, 避免了多种数据处理软件间数据切换的繁琐。
2. SCIEX OS软件集成了更简便的数据分析功能, 可以同时进行靶向和非靶向数据提取, 高分辨MS/MS数据库进行匹配分析, 同时结合植物成分结构特征进行中性丢失、特征碎片、质量亏损过滤, 快速找到相关成分。
3. MarkerView™软件能够快速进行数据的导入和PCA分析等统计分析, 帮助实验人员快速发现植物间种属关系, 找到共存与差异特征化合物, 为实验人员解决了海量数据处理困难, 是大批量样本分析的利器。

参考文献

1. 焦必宁, 陈爱华. 国内外柑桔农药最大残留限量标准分析[J]. 现代科学仪器, 2007, 17(1).
2. 冉玥, 焦必宁, 赵其阳, et al. 超高效液相色谱法同时测定柑橘中11种类黄酮物质[J]. 食品科学, 2013, 34(4):168-172.
3. 郑洁, 赵其阳, 张耀海, et al. 超高效液相色谱法同时测定柑橘中主要酚酸和类黄酮物质[J]. 中国农业科学, 2014, 47(23):4706-4717.
4. 刘均玉. 橘皮的化学成分与黄酮类化合物的提取、纯化研究[D]. 福建:福建师范大学, 2009.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。

获取有关具体可用信息, 请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。

本文提及的商标和/或注册商标的所有权, 归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-10595-ZH-A



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

上海公司及中国区应用支持中心
地址: 上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419 7200
传真: 021-2419 7333

广州分公司
地址: 广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510 0200
传真: 020-3876 0835

全国免费垂询电话: 800 820 3488, 400 821 3897 网址: sciex.com.cn 官方微信: ABSciex-China