通过离子淌度筛查技术来增加ionKey/MS系统分析食品中的农药残留的选择性

¹M. McCullagh, ¹D. Douce, ²V. Hanot, 和 ²S. Goscinny

- 「沃特世公司(英国威姆斯洛)
- ²Wetenschappelijk Instituut Volksgezondheid Institut Scientifique de Santé Publique (比利时布鲁塞尔)

应用优势

- 通过结合iKey™微流LC技术提高离子 淌度碰撞截面(CCS)测量的选择性。
- 更高的电离/传输效率可为复杂 食品类商品中的农药残留检测提供 更高的灵敏度。
- 通过样品稀释消除基质抑制作用, 提高MRL(最大残留量)水平的谱图质量。
- 结合CCS数据与精确质量数测量提高 选择性。
- 在拓宽保留时间筛查窗口、保证质量数 准确度的同时避免误检,并以严格的 CCS标准进行数据筛查。

沃特世解决方案

ionKey/MS™系统

iKey分离仪

ACQUITY UPLC® I-Class系统

ACQUITY UPLC M-Class系统

沃特世(Waters®)离子淌度质谱系统

UNIFI®科学信息系统

MassLynx®质谱软件

关键词

农药, CCS, 离子淌度, 基质抑制

简介

随着化合物的种类不断增加,以及需要采用通用萃取方法在低浓度水平进行监测的食品类商品成分越来越复杂,食品中的农药残留分析变得越来越有挑战性。我们首要面临的挑战就是越来越复杂的提取物(含有基质化合物),分析这类样品时必须执行多次进样,同时还需兼顾驻留时间和工作周期的平衡。筛查方法是一种非常实用的替代性选择,而全扫描高分辨率质谱(HRMS)就具备高特异性以及使用通用仪器参数同时检测大量分析物的能力。虽然飞行时间(Tof)质谱具有更高的灵敏度和分辨率,但是当我们面对含有大量共提取基质组分的样品时,使用该系统无法快速有效地鉴定目标化合物。

全谱图采集和精确质量数测量具有公认的出色特异性,它们通常与保留时间偏差、同位素匹配、碎片离子/比率以及响应阈值结合使用,用于减少筛查分析中的假阳性和假阴性检测结果。质谱技术的发展已大大提高了全谱图分析的灵敏度,但进一步提高其灵敏度将能够改善质谱数据的质量。这一点对于保证母离子和碎片离子信息的准确性非常重要,还可确保分析在比法规要求更低的水平达到高质量数准确度。已有文献报道了使用ionKey/MS系统成功提高了分析灵敏度的相关研究¹。ionKey/MS允许通过样品稀释降低基质抑制作用,从而提高分析物的整体信噪比。

[应用纪要]

在本应用纪要中,我们探究了高选择性碰撞截面 (CCS) 测量的应用,结合更高的灵敏度和更低的基质抑制作用,对复杂食品类商品基质中的残留物进行了分析。行波离子淌度质谱 (IM-MS) 使用可实现碰撞截面测量的氮气缓冲气体,为复杂混合物分析提供了独特的优势。该系统结合了高分辨率质谱以及基于离子淌度的高效测量和分离方法。IM-MS是一项快速的正交气相分离技术,能在LC时间范围内获得另一个维度的分离。根据化合物的大小、形状和电荷,可以对化合物进行区分。

碰撞截面 (CCS) 值是稳定而精确的离子理化性质。它是与离子化学结构和三维构象相关的一个重要区分特征。CCS测量已被纳入UNIFI科学信息系统的科学数据库中,分析人员可使用预期CCS值和测定所得的CCS值筛查和确认农药残留²。本文中我们将CCS值(来自离子淌度漂移时间)用作一种新的参数,用于实现更高的选择性和更准确的鉴定。本ionKey筛查研究展示了CCS如何降低分析人员对基于保留时间的筛查方法的依赖。CCS测量方法让分析人员能够应用通用的处理参数来鉴定此前已应用多种色谱方法进行鉴定的目标化合物。

实验

LC条件

LC系统: nanoACQUITY® UPLC® 流动相: A: 100%水 (0.1%甲酸)

B: 100%乙腈(0.1%甲酸)

梯度:

	流速	流速		
时间	(μL/min)	(µL/min)		
(<u>min</u>)	<u>UPLC</u>	<u>iKe</u> y	<u>%A</u>	<u>%B</u>
0.0	450	1	98.0	2.0
0.25	450	1	98.0	2.0
12.25	450	1	1.0	99.0
13.00	450	1	1.0	99.0
13.01	450	1	98.0	2.0
13.00	450	1	98.0	2.0
17.00	450	1	98.0	2.0

流速: UPLC为450 µL/min; iKey为1.0 µL/min

进样体积: UPLC: 5 μL (满定量环);

iKey: 2 µL (满定量环)

UPLC色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C,100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm

柱温: 30℃

iKey色谱柱: iKey BEH C₁₈分离仪, 130Å, 1.7 μm,

 $150 \, \mu m \times 100 \, mm$

柱温: 45℃

MS条件

MS系统: SYNAPT® G2-Si

电离模式: ESI+

质量数范围: 50-1200 m/z 采集速率: 5谱图/s 毛细管电压: 1 kV 锥孔电压: 20 V 缓冲气体: N2 碰撞能量梯度: 10-45 eV

MS波速范围: 650 m/s IMS波高: 40 V IMS气体流速: 90 mL/min

IMS工作周期: 10.8 ms

锁定质量数: m/z 556.2766(亮氨酸脑啡肽)

样品描述

本次分析采用基质加标的分析方案,分析的基质样品包括: 柑橘、姜、韭菜和梨。

样品制备

提取条件: 使用Ultra-Turrax设备,用60 mL 20 mM的醋酸铵 甲醇溶液提取10 g匀浆样品。过滤粗萃取物,进样前用 5 mM的醋酸铵水溶液将其稀释至100 mL。

使用有机柑橘样品绘制基质匹配校准曲线,并根据欧盟委员会规定的水果和蔬菜中农药残留的技术测试方法分析了此前的欧洲环试验FV-13样品(FV-13柑橘匀浆,2011)。

加标方案

将有机样品进行匀浆处理,取10g用60 mL 20 mM醋酸铵的甲醇/水 (95:5; v/v)溶液进行提取。然后将5 mL和3 mL的粗提取物转移至6个容量瓶中。针对0.01、0.05和0.1 mg/kg水平的加标,我们分别加入了50、250和500 μ含0.1 μg/mL目标农药的混合溶液。针对0.2、0.5和1 mg/kg水平的高浓度加标,我们分别加入了100、250和500 μL含1 μg/mL目标农药的混合溶液。然后用5 mM醋酸铵的水/甲醇 (90/10;v/v)溶液定容到5 mL。

色谱方法	农作物样品的 初始质量	最终提取物中的 农作物当量	加标浓度 (mg/kg)	溶液 浓度 (ng/mL)	提取过程中的 稀释因子
ACQUITY UPLC	10 g	0.1 g/mL	0.01	1	x100
iKey	10 g	0.01 g/mL	0.01	0.1	x1000

表1. 在UPLC和iKey的比较分析中,使用Granby提取方法制备样品时采用的加标浓度、溶液浓度和稀释因子。

基质对比

我们采用了不同的进样体积和不同稀释水平的样品,以期获得不同柱上进样量条件下的对比性结果(表2)。在研究 ionKey/MS降低基质抑制效应的实验中,我们用25%水:75% 乙腈稀释样品。

参数	色谱模式和样品上样详细信息		
	iKey	UPLC	
进样溶剂组成	25(H ₂ 0):75(MeCN)	MeOH	
应用于最终提取物的稀释因子	X1000	X100	
加标浓度	1	0.1	
最终提取物中	10 ng/mL	10 ng/mL	
农药溶液的浓度(ng/mL)			
基质负载(ng/mL)	0.01 ng/mL	0.1 ng/mL	
进样体积(μL)	2 μL	5 μL	
定量环规格(μL)与进样模式	2 μL	5 μL	
柱上质量(pg)	20 pg	50 pg	

表2. 通过基质提取物分析直接对比iKey和UPLC色谱系统的研究中所采用的参数。

iKey分离仪(部件号: 186007256, 图1)配备有直径为 150 μm的分离通道,其中填充有了1.7 μm, ACQUITY UPLC BEH C₁₈固定相。iKey的温度被设置为45 ℃,从分离通道中流出的洗脱液流直接进入集成的ESI发射体。将iKey 插入源外壳并锁定到位后,所有的微流体、气体和电子接口将自动接合。



图1. 配备流体/电子接口和电离发射体的ionKey/MS离子源和iKey分离仪。

IMS校准

T-Wave™离子淌度校准采用的是提前测定得到的多聚丙氨酸 CCS值,执行离子淌度校准时,我们使用了多聚丙氨酸和 行波氮气缓冲气体。我们之前已使用He漂移管衍生的校准 物生成了执行CCS校准所需的多聚丙氨酸 (™CCS) 值,并用 软件将 N_2 值转换为He值。因此本研究中描述的碰撞截面 为 $^{\text{IVCCS}}_{\text{He}}$ 值 3 。在本项目的后期阶段,为了开发CCS筛查工作 流程,我们在执行CCS校准时采用了 Ω_{N2} 漂移管生成的正离子和负离子模式下的多聚丙氨酸CCS值,这样就生成了 $^{\text{IVCCSN}}_2$ 值 4 。

结果与讨论

本研究为农药CCS筛查工作流程开发项目的一部分,所述项目比较了在5款Waters ACQUITY UPLC I-Class和SYNAPT HDMS®系统上执行CCS筛查的可行性。本研究基于对样品提取物(梨、姜、韭菜和柑橘样品)中添加标准品、以及质量控制样品的分析,其中质量控制样品为使用ionKey/MS系统的EU-RL(欧盟参比实验室)能力测试中规定的样品。系统由nanoACQUITY UPLC系统、SYNAPT G2-Si质谱仪、ionKey离子源和iKey分离仪组成,并由MassLynx MS软件控制。

首先,我们使用ionKey/MS离子源采集了一系列溶剂标准品混合物的离子淌度数据。使用这些数据生成保留时间信息和CCS测量值,然后用于UNIFI的iKey农药数据库。随后,这些测量值被用于准确鉴定基质匹配样品和能力测试样品中的农药残留物。

我们将所得结果与之前使用传统UPLC和离子淌度MS得到的分析结果进行了比较。之前的研究表明CCS筛查具有谱图净化、避免假阳性结果以及发现农药原体等优势57。

与之前的UPLC-IM-MS研究相比,使用ionKey/MS所得的结果不仅兼具高灵敏度和信噪比,而且大部分基质匹配校准物均具有出色的线性相关系数 ($r^2 \ge 0.95$)。更高的灵敏度使得分析人员可以进行基质稀释,可检测出柱上浓度仅为 $1 pg/\mu L$ 的农药,同时还能获得母离子和离子淌度产物离子,如图2中的氟醚唑分析结果所示。图3展示了使用ionKey/MS离子淌度分析柑橘基质匹配样品中的农药所得的示例线性图及相关系数。

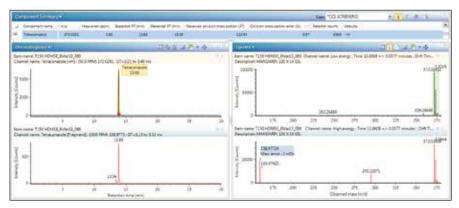


图2. UNIFI软件组分汇总,显示了使用ionKey/MS离子淌度方法分析1 pg/μL氟醚唑农药所得的响应结果。 图中展示了保留时间和漂移时间校准的母离子和离子淌度产物离子谱图,以及对应的提取质谱图。 列出了观察到的CCS值和CCS误差以及保留时间。

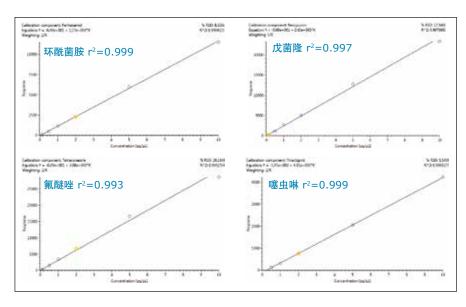


图3. 使用ionKey/MS分析柑橘基质匹配样品中的农药得到的相关系数, r^2 = 0.99 (0.1-10 $pg/\mu L$)。

[APPLICATION NOTE]

本ionKey/MS CCS筛查研究的重点是在UPLC离子淌度农药残留分析中利用CCS测量提高分析的灵敏度。在本研究中,我们使用之前测定的CCS值作为鉴定点来快速测定农药溶剂标准品的保留时间以及鉴定之前的能力测试样品中的农药残留。iKey和UPLC色谱采用相同的色谱梯度,但得到了不同的保留时间,因此有必要在UNIFI中创建包括iKey保留时间数据的可用农药数据库。传统方法需要我们手动执行初始的数据解析以生成iKey保留时间数据库,在这种情况下,我们可使用之前所得的UPLC CCS值,利用CCS的选择性与母离子质量数相结合来鉴定目标分析物。我们使用10 ppm的精确质量数测量偏差和10%的CCS偏差筛查目标残留物的ionKey/MS离子淌度数据。由于我们不知道iKey保留时间,所以采用了与色谱运行时间相同的30 min保留时间窗口。

所得结果如图4所示,利用上述筛查参数,EURL技术测试样品FV-13中检测出了81种残留物。然后我们使用2%的CCS测量偏差和150的响应阈值对已处理的数据进行过滤,很快获得了农药溶剂标准品和FV-13技术测试样品中的残留物的ionKeu/MS保留时间。

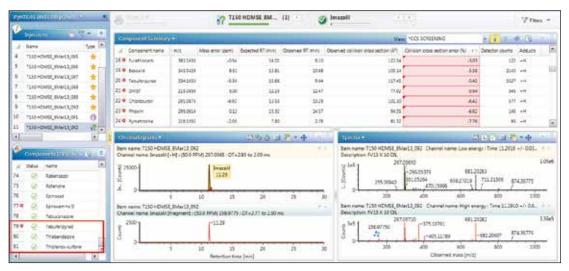


图4. EU RL技术测试FV-13农药残留筛查的ionKey/MS离子淌度结果,筛查目标残留物时采用10 ppm的精确质量数测量容差和10%的CCS容差。为确定未知iKey保留时间,我们采用了30 min保留时间窗口,观察到81种残留物(用红色突出显示)。

在该初步研究中,我们使用CCS过滤条件去除了未确定CCS值但被录入了UNIFI数据库的化合物。如图5所示,使用该方法,我们能够快速确定同一分析样品中是否存在预期可检出的8种农药残留。针对采用10 ppm的偏差参数和30 min保留时间窗口初步获得的81种分析物,我们将CCS作为过滤条件应用于处理所得的数据,将分析物种类减少至9种。无需重新处理数据。

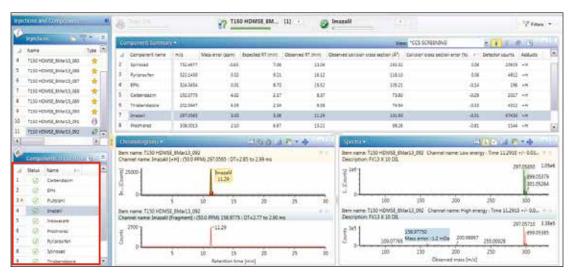


图5. EU RL能力测试FV-13农药残留筛查的lonKey/MS离子淌度结果。采用2% CCS误差和阈值响应对数据进行过滤,得到9种残留物(以红色突出显示)。

利用溶剂标准品混合物,我们可借助iKey色谱技术快速测定保留时间。确定保留时间后,我们使用0.2 min保留时间偏差窗口、10 ppm质量数准确度偏差和2% CCS误差偏差对数据进行了过滤。预期的8种检出化合物均未出现假阳性或假阴性结果。这清楚地展示了CCS测量的优势和高选择性,采用该方法,农药可基于准确的质量数和碰撞截面进行鉴定。能力测试样品FV-13的检出残留物的预期保留时间与实际测得的保留时间存在7 min范围内的差异。例如,以下两种分析物具有不同的色谱保留时间:伊米萨利 (UPLC 5.08 min/iKey 11.29 min)、噻菌灵 (UPLC 2.34 min/iKey 8.58 min)。CCS值用于确定保留时间并输入UNIFI iKey农药筛查数据库,这进一步证明了CCS选择性的重要作用。

图4和图5进一步说明了离子淌度选择性的优势,图中选择了伊米萨利,显示了其母离子谱图和碎片谱图。图4中显示了保留时间11.29 min处的保留时间校准碎片谱图,其中包括大量色谱共洗脱组分。而在图5中,我们选择了保留时间校准和离子淌度漂移时间校准的数据(11.29 min/2.92 ms),由图可见,借助离子淌度的分离度,我们获得了高选择性的数据。现在谱图已被有效"净化",因为与伊米萨利色谱共洗脱的组分已通过离子淌度实现了分离。因此,我们可为采集中检测到的所有分析物生成离子淌度特异性产物离子。

如图6所示,结合使用ionKey/MS和离子淌度技术,我们获得了柱上样量为2 pg的戊菌隆的母离子和离子淌度产物离子谱图。精确质量数测量和诊断性离子淌度产物离子为实现准确鉴定提供了保障。然而,我们可观察到柱上样量为200 fg的戊菌隆也可被检出。即使只观察到单同位素峰,也可准确进行鉴定,因为CCS (0.51%)可为确定的0.86 ppm质量数测量误差提供额外的鉴定因素。已有研究表明,Q-Tof™质谱平台与ionKey联用可获得更高的电离效率和灵敏度¹。



图6. 精确质量数测量(<1 ppm)、 母离子、离子淌度产物离子 以及碰撞截面(<1%)有助于对 柱上进样量为2 pg和200 fg的 戊菌隆实现准确鉴定。

图7展示了使用iKey/SYNAPT G2-Si系统分析EU RL技术测试样品FV-13中的茚虫威的分析结果,可以看到分析获得了更高的信噪比(增大4倍)和更高的响应(增大3倍)。计算响应的增量时我们将ionKey/MS农药残留物分析时的进样体积和10倍的样品稀释操作都考虑在内。该方法的高选择性和灵敏度可用于检查和确证可疑的MRL违规。

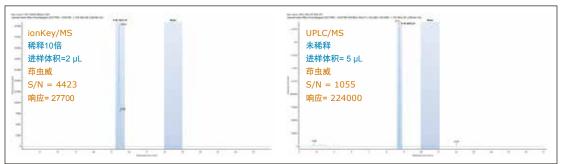


图7. 采用UPLC/MS和ionKey/MS 分析茚虫威时的信噪比和 响应比较,其中ionKey/MS的 信噪比比UPLC扩大了4倍, 响应比UPLC扩大了3倍。

结论

- lonKey/MS结合离子淌度技术可为复杂基质分析提供独特的优势:
 - 谱图净化
 - 利用碰撞截面测量在鉴定中获得独特的选择性并提高结果可靠性。
- 阐明了离子淌度的选择性,利用精确质量数测量和CCS测量成功 检测了之前的EU RL能力测试样品FV-13中的农药残留。
- 利用灵敏度的提高以及ionKey离子源的高传输效率和电离效率实现了戊菌隆质量数测量,CCS测定在200 fg的柱上进样量条件下为单同位素峰提供了额外的鉴定因素。
- 农药的基质匹配标准品校准结果呈线性,且相关系数> r²=0.95。
- 对分析人员而言,这一先进的ionKey技术与常规离子淌度筛查配合, 能够为"常规使用"的平台增加微流体色谱的优势。

参考文献

- M McCullagh, S Goscinny, V Hanot, R T Worster, and D Douce. Exploring the Benefits and Potential of iKey Microfluidic Chromatography and Time-of-Flight Mass Spectrometry for Pesticide Residue Analysis. Waters Application Note No. 720005195en. October, 2014.
- The use of Collision Cross Section (CCS) Measurements in Food and Environmental Analysis. Waters Technical Note No. 720005374en. April 2015
- http://www.indiana.edu/~clemmer/Research/Cross%20 Section%20Database/Peptides/polyaminoacid cs.htm.
- MF Bush, ID Campuzano, and C V Robinson. Ion Mobility Mass Spectrometry of Peptide Ions: Effects of Drift Gas and Calibration Strategies. *Anal Chem.* 84: 7124–7130, 2012.
- M McCullagh, G Cleland, V Hanot, J Williams, S Goscinny. Collision Cross Section a New Identification Point for a "Catch All" Non Targeted Screening Approach. Waters Application Note No. 720005055en, June, 2014.
- M McCullagh, V Hanot, and S Goscinny. Use of Ion Mobility Spectral Cleanup and Collision Cross Section Values to Increase Confidence and Efficiency in Pesticide Residues Screening Strategies. Waters Application Note No. 720005080en. June, 2014.
- M McCullagh, D Eatough, V Hanot, and S Goscinny. Discovery of Pesticide Protomers Using Routine Ion Mobility Screening. Waters Application Note No. 720005028en, June, 2014.



扫一扫,关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, UPLC, SYNAPT, UNIFI, MassLynx, HDMS, nanoACQUITY和The Science of What's Possible 是沃特世公司的注册商标。iKey, ionKey, ionKey/MS, Q-Tof和T-Wave是沃特世公司的商标。 其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年沃特世公司。印制于中国。2015年6月 720005427ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司 沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866 上海: 021 - 6156 2666 广州: 020 - 2829 5999 成都: 028 - 6765 3588 香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676

www.waters.com