

离子淌度^{TW}CCSN₂值在非靶向食品添加剂筛查中的应用

Michael McCullagh, Jeff Goshawk, Séverine Gosciny

Waters Corporation, Sciensano

摘要

在农药筛查分析中运用离子淌度^{TW}CCSN₂的开创性策略已有诸多研究案例⁴⁻⁶，^{TW}CCSN₂在小分子分析中的常规应用也涵盖多个研究领域，包括包括制药（代谢、代谢组学和脂质）、法医毒理学、食品安全（兽药、真菌毒素、类固醇、甜菊糖苷、天然产物筛查和天然毒素）⁷⁻¹⁰。研究人员根据既有研究构建了可供搜索的^{TW}CCSN₂数据库，并将^{TW}CCSN₂值用作筛查参数来提高鉴定特异性，减少误检。这一策略采用了一种针对多种添加剂的色谱分析方法以及MS数据库（包含^{TW}CCSN₂值），用于对“现货”食品中的FA进行非靶向筛查研究。

优势

- 利用常规UPLC-IM-MS策略生成同时包含正离子和负离子模式数据的多参数食品添加剂数据库
- 将诸如保留时间、碰撞截面、母离子/离子淌度子离子精确质量数测量值等筛查参数相结合，可以提高非靶向食品添加剂筛查分析的检测特异性
- 研究所述的食品添加剂数据库中涵盖了甜味剂、食用色素、抗氧化剂和防腐剂
- 与FA CCS数据库的预期值相比，FA在正离子和负离子模式下常规检测的 $\Delta^{\text{TW}}\text{CCSN}_2 < 2\%$
- 获得的检测结果应用了更大且更灵活的分析后处理工作流程容差（由多因子质谱筛查参数的正交性提供）

简介

食品添加剂(FA)的使用虽然受到各大欧盟(EU)法案的严格监管¹，但各国家监管机构仍然有责任确保采取有效措施，监控食品添加剂在其辖区内的消耗情况²。为满足这些要求，针对市面上琳琅满目的商品，我们需要所用的分析方法能够定量各种食品类型中的这些物质。业界目前已经成功实施了许多分析应用，但这些应用通常只涉及极少数的添加剂和/或食品基质。在这种情况下，考虑到市面上的产品名目繁多，因此，监测食品中的添加剂含量非常具有挑战性且成本高昂。我们开发出一种通用性更强、通量更高的多重分析方法，仅用一次分析即可灵活测定尽可能多的FA，从而提高分析过程的效率。此类方法对于需要管控的食品添加剂成分具有更高的覆盖率，此外还可以仅用一次分析来评估每个样品中多种FA的暴露量。

欧盟法规中规定，FA是指“本身通常不作为食品使用，也不是食品的某种特征成分的任何物质，不论其是否具有营养价值”³。这些物质须在经过欧洲食品安全局(EFSA)安全评估并由欧盟委员会授权批准之后才能用于食品。授权批准的前提是未观察到对健康构成危害，以及产品的使用符合欧盟法规（例如，因技术需要和对消费者有益）。理想情况下，通过实施国家食品控管体系来执行法规应涵盖该国家/地区内销售的所有食品。同样，在风险评估中，我们也需要分析大量产品，以获得FA每日摄入量的代表性估算值。为解决样品基质数量不断增加，且FA（已授权批准/未授权批准）名目繁多的问题，开发有效且可靠的分析方法至关重要。

我们考察了在质谱数据库中纳入^{TW}CCSN₂（使用氮气作为缓冲气体测量的行波碰撞截面）指标的实用性。UPLC-IM-MS（超高效液相色谱离子淌度质谱）包括离子淌度质谱（IMS；MS分析之前的气相分离）和UPLC（中性物质分离）。UPLC（秒）、IMS（约10毫秒）和飞行时间MS（微秒）的嵌套时间尺度符合复杂样品的高通量分析要求。化合物IM分离的原理是：气相离子在仪器中质量分析器之前的行波离子淌度(TWIM) RF离子导向装置内分离。淌度分离通过使用相对较弱的电场驱动离子包穿过低压惰性缓冲气体（通常是氮气）来实现。分离结果取决于分子的质量、电荷和形状等因素。这种方法不仅可以得到^{TW}CCSN₂作为一种补充性的鉴定指标，还为LC和MS提供了额外的分离维度。

在农药筛查分析中运用离子淌度^{TW}CCSN₂的开创性策略已有诸多研究案例⁴⁻⁶，^{TW}CCSN₂在小分子分析中的常规应用也涵盖多个研究领域，包括包括制药（代谢、代谢组学和脂质）、法医毒理学、食品安全（兽药、真菌毒素、类固醇、甜菊糖苷、天然产物筛查和天然毒素）⁷⁻¹⁰。研究人员根据既有研究构建了可供搜索的^{TW}CCSN₂数据库，并将^{TW}CCSN₂值用作筛查参数来提高鉴定特异性，减少误检。这一策略采用了一种针对多种添加剂的色谱分析方法以及MS数据库（包含^{TW}CCSN₂值），用于对“现货”食品中的FA进行非靶向筛查研究。

实验

样品描述

本研究筛查了以下食品中的食品添加剂：红色水果酸奶(YB)；草莓酸奶(YS)；功能饮料(D1)；“零糖”柠檬饮料(D2)；“零糖”草莓猕猴桃饮料(D3)；无色滋补饮料(D4)；柠檬汽水饮料(D5)。（注：“零糖”表示不添加糖。）

样品前处理

软饮料：使用H₂O按10:1和100:1稀释

酸奶提取方法：称取酸奶样品(15 g)加入沃特世50 mL螺口盖离心管中。加入10 mL含1%乙酸的乙腈溶液作为萃取溶剂，然后使用涡旋混合器剧烈混合试管1分钟。向试管中加入无水MgSO₄ (6 g)和醋酸钠(1.52 g)，诱导相分离。立即振摇样品1分钟，然后在4 °C下以1500 rcf离心5分钟。将上清液(8 mL)倒入盛有MgSO₄ (1.2 g)、PSA (410 mg)和C₁₈ (404 mg)的离心管(50 mL)中，对样品进行分散式SPE (dSPE)。将样品涡旋混合1分钟，并在4 °C下以1500 rcf离心5分钟。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测：	离子淌度质谱
样品瓶：	通过LCMS认证的12 × 32 mm螺口透明玻璃全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积1 mL (P/N: 600000671CV)
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS T3 100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm (P/N: 186003539)
柱温：	45 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 μL
流速：	0.4 mL/min

流动相A:	水+ 10 mM醋酸铵 (含0.1%甲酸)
流动相B:	甲醇/乙腈(1:1) + 10 mM醋酸铵 (含0.1%甲酸)
梯度:	0–0.5 min等度(95:5(A:B)); 6.0 min (0:100); 9.0 min (0:100); 9.5 min (95:5); 11.0 min (95:5)

MS条件

质谱系统:	SYNAPT G2-Si
电离模式:	ESI+和ESI-
毛细管电压:	3 kV (ESI+); 2.2 kV (ESI-)
锥孔电压:	30 V
脱溶剂气温度:	550 °C
离子源温度:	150 °C
采集范围:	m/z 50–1200
采集速率:	每秒10幅谱图
实时校正标准液:	亮氨酸脑啡肽 ($C_{28}H_{37}N_5O_7$ (m/z 556.2766 +ve) 和 (m/z 554.2620 -ve))
碰撞能量:	HDMS ^E 低碰撞能量(4 eV), 高碰撞能量梯度(10–45 eV)

MS分辨率:	m/z 556处的半峰全宽(FWHM)分辨率为20,000
IM分辨率:	$\approx 40 \Omega/\Delta\Omega$ (FWHM)
IMS参数:	缺省IMS筛查参数包括: T-Wave速度梯度 = 开始 : 1000 m/s, 结束: 300 m/s; T-Wave脉冲高度 = 40 V, 在相应的气体池中使用氦气流180 mL和氮气流(缓冲气体) 90 mL, 使IM池压力达到约3.2 mBar
校准:	IMS/ToF校准试剂盒 (P/N:186008113)

数据管理

色谱软件:	MassLynx 4.1版SCN 916/924
质谱软件:	MassLynx 4.1版SCN 916/924
信息学软件:	使用UNIFI v1.94对MassLynx数据进行后处理

结果与讨论

我们使用标准化的数据库生成方案开发出适合LC-MS食品添加剂分析的正离子和负离子质谱数据库¹¹。所用的策略可测定母离子、离子淌度离子和碰撞截面值。生成的数据库中包含各类食品添加剂的数据, 例如色素、防腐剂、抗氧化剂和甜味剂(包括禁用甜味剂甘草甜素)。图1显示了使用离子淌度技术表征的食品添加剂类别示例。

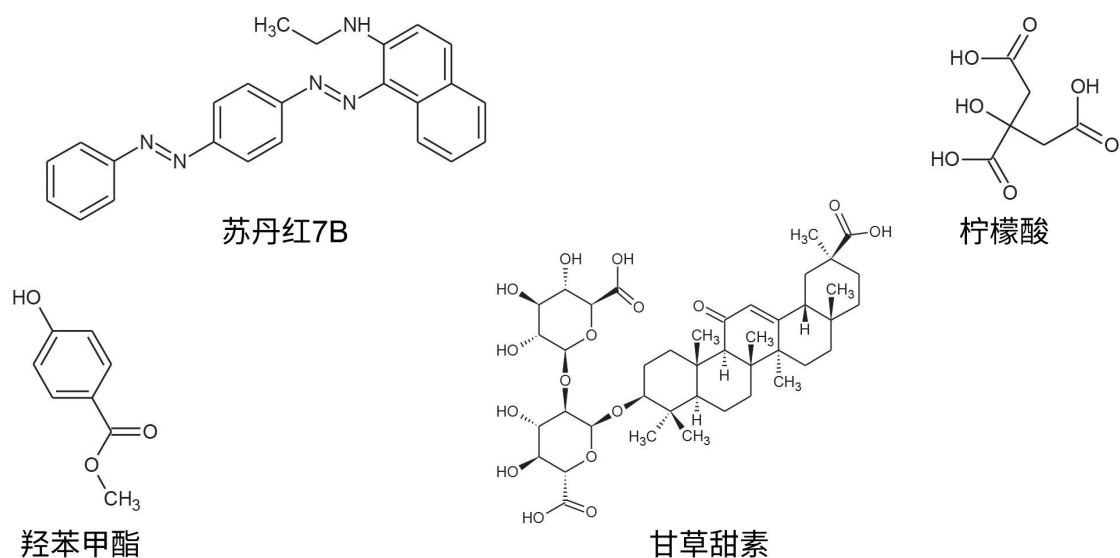


图1.生成的MS数据库中包含的食品添加剂类别示例：色素（苏丹红7B）、防腐剂（对羟基苯甲酸甲酯）、抗氧化剂（柠檬酸）和甜味剂（甘草甜素）。

我们从比利时的超市购买了七个标明含有多种FA（包括甜味剂、防腐剂和食用色素）的“现货”食品样品，使用针对多种FA的分析方法来执行样品分析，测试生成的^{TW}CCSN₂数据库的稳定性。在正离子和负离子模式下采集UPLC HDMS^E数据，比较了母离子/离子淌度子离子和食品添加剂数据库中的^{TW}CCSN₂。

使用“盲法”测试食品D2（无色柠檬软饮料），检出两种甜味剂（乙酰磺胺酸E 969和三氯蔗糖E 955）和一种食品防腐剂（柠檬酸E330），且鉴定结果为阳性，精确质量数测量值为2 ppm，^{TW}CCSN₂ Δ <2%。未在样品D2中检出色素。图2显示了在样品D2中鉴定出的食品添加剂和天然成分橙皮苷的负离子HDMS^E母离子/淌度子离子谱图以及CCS值。



图2.在柠檬软饮料中检出的甜味剂和抗氧化剂FA的负离子 $HDMS^F$ 母离子/子离子谱图(D2)。

图3显示了所生成的 $^{TW}CCSN_2$ 数据库的值，其中包含在食品D3（草莓猕猴桃饮料）中鉴定出的食用色素（甜蜜素E 952）、抗氧化剂（柠檬酸E 330）和甜味剂（阿斯巴甜E 951和乙酰磺胺酸钾E 950），还显示了阿斯巴甜的负离子 $HDMS^F$ 离子淌度母离子/离子淌度谱图。对阿斯巴甜进行高特异性非靶向筛查获得的离子淌度子离子谱图（经保留时间/漂移时间校准）显示，子离子质量精度在1 mDa以内（ m/z 97.0404 = -4.12 ppm， m/z 146.0606 = -3.4 ppm， m/z 200.0712 = -2.5 ppm， m/z 261.0878 = -1.14 ppm）。对于鉴定出的食品添加剂，观察到 $\Delta^{TW}CCSN_2 < 2\%$ 。此外，使用食品添加剂 $^{TW}CCSN_2$ MS数据库筛查食品时，未见误检结果。

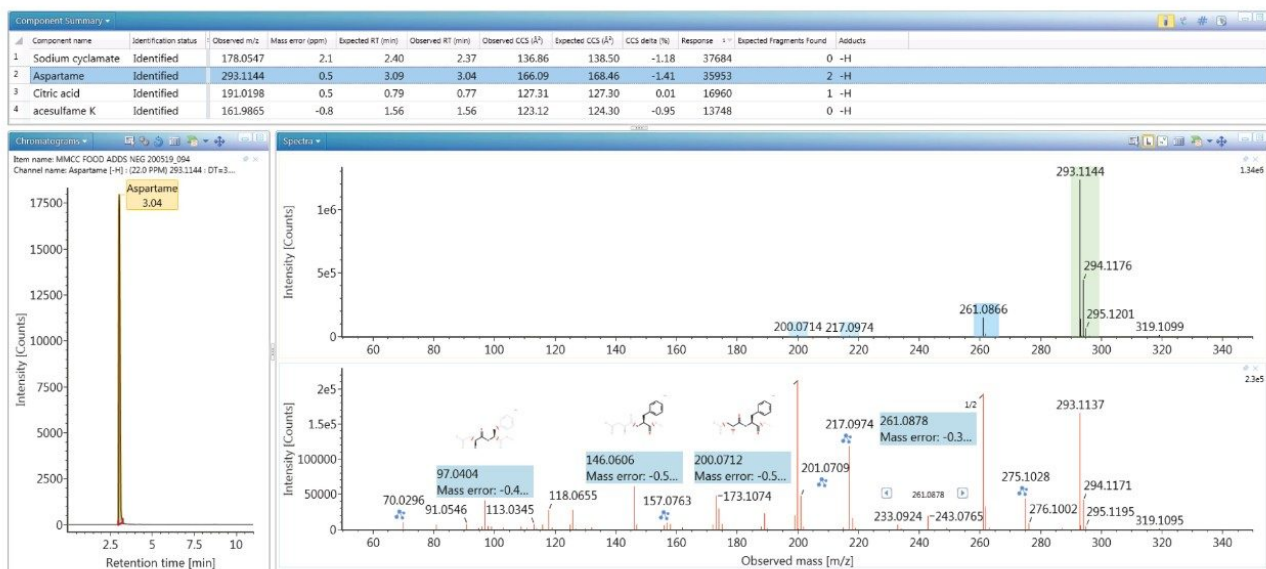


图3.在草莓猕猴桃软饮料(D3)中检测到的阿斯巴甜的负离子 $HDMS^E$ 母离子/子离子谱图。鉴定出色素和甜味剂。

我们还向几种食品中添加了一系列食品添加剂色素和甜味剂，来评估该数据库在筛查分析中的稳定性。食品D4是一种无色滋补饮料，预计不会检出食用色素添加剂，如图4所示，该图显示了添加剂乙酰磺胺酸钾(E 950)的负离子 $HDMS^E$ 母离子/子离子谱图，以及化合物E 330和E 955的检测结果。我们向滋补饮料D4中添加了一系列额外的甜味剂和色素，组分汇总检测结果如图5所示，表明正确检出未授权批准的甜味剂：阿力甜和甘草甜素。图6显示了甘草甜素(E 958)检测的淌度离子流图和 $HDMS^E$ 母离子/子离子谱图，其中甘草甜素的 $^{TW}CCSN_2=286.2 \text{ \AA}^2$ ($^{TW}CCSN_2 \Delta = -0.3\%$)。图7显示了食品添加剂数据库成分阿力甜(E 956)的正离子 $HDMS^E$ 母离子和离子淌度子离子谱图，图中显示了+ve和-ve淌度离子流图以及各自的测量值 $172.3 \text{ \AA}^2/176.4 \text{ \AA}^2$ 。在只能测定单同位素信息的情况下，这些已表征的 $^{TW}CCSN_2$ 值的组合特异性可用于确认痕量检测。所得结果证实了FA数据库的稳定性，通过结合保留时间、母离子/离子淌度子离子 m/z 和CCS值，我们可以筛查预期和非预期的食品添加剂。与MS数据库相比，CCS测量的常规测定偏差小于2%（相比之下，通常接受的MRM比率筛查容差为20%），提高了分析可信度，因此， $^{TW}CCSN_2$ 可以在至关重要的食品安全研究的灵活筛查数据处理工作流程中，与保留时间和 m/z 一起用作一种稳定可靠的鉴定指标。

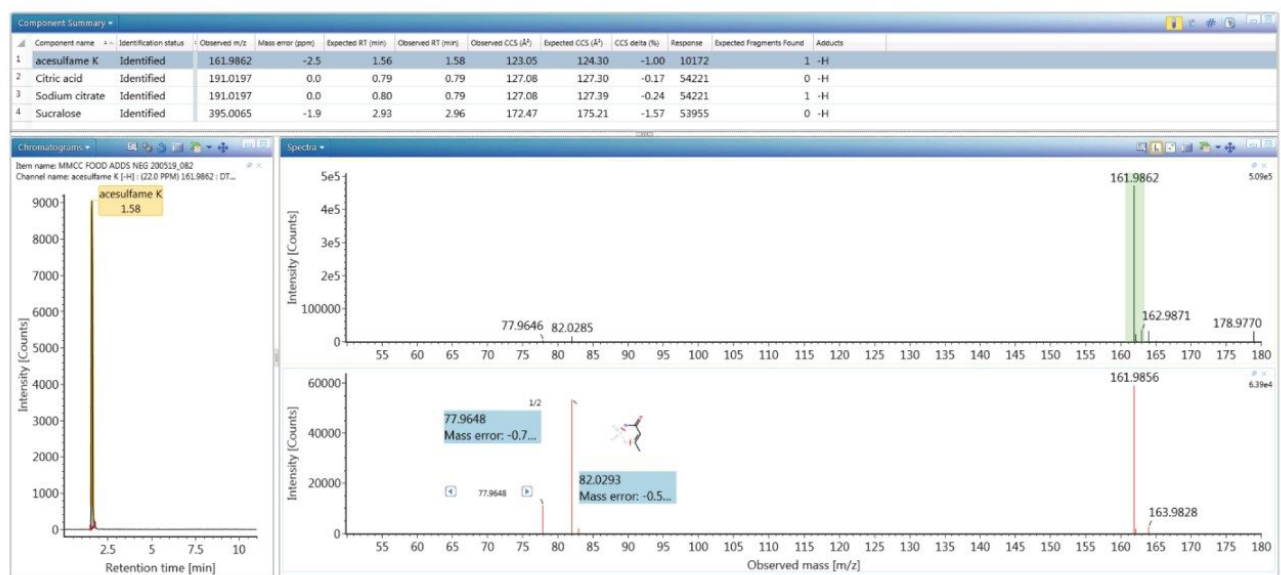


图4.在无色滋补饮料(D4)中检出的乙酰磺胺酸钾的负离子 $HDMS^E$ 母离子/子离子谱图。鉴定出添加剂E 330、E 955和E 950。

Component name	Identification status	Observed m/z	Mass error (ppm)	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Observed CCS (Å ²)	Expected CCS (Å ²)	CCS delta (%)	Response	Adducts
acesulfame K	Identified	161.9861	-3.5	1.56	1.57	123.14	124.30	-0.93	14851	-H
advantame	Identified	457.1984	0.9	4.21	4.18	205.20	206.58	-0.67	71195	-H
alitime	Identified	330.1486	-2.2	3.44	3.44	174.21	176.44	-1.26	40939	-H
Allura Red AC	Identified	451.0267	-1.9	2.79	2.77	210.52	212.96	-1.15	14919	-H
Amaranth	Identified	536.9727	-1.9	1.83	1.86	223.88	224.03	-0.06	1268	-H
Aspartame	Identified	293.1141	-0.6	3.09	3.04	165.94	168.46	-1.49	48183	-H
Carminic acid	Identified	491.0836	0.9	2.70	2.64	205.11	207.08	-0.95	64868	-H
Citric acid	Identified	191.0195	-1.0	0.79	0.77	127.06	127.30	-0.19	35530	-H
Cochineal red A	Identified	536.9737	-0.2	2.24	2.29	220.36	222.46	-0.94	3261	-H
Erythrosin B	Identified	834.6497	2.3	5.17	5.16	215.99	217.89	-0.87	54750	-H
Glycyrrhizin	Identified	821.3984	2.3	5.00	4.99	286.54	286.95	-0.14	48018	-H
Neohesperidin 1	Identified	609.1818	-1.2	3.55	3.54	227.62	227.15	0.21	28236	-H
Neohesperidin 2	Identified	609.1818	-1.2	3.55	3.54	239.13	239.14	0.00	9769	-H
Neotame	Identified	377.2071	-3.0	4.74	4.71	195.59	197.14	-0.79	65382	-H
ponceau 6R	Identified	457.0169	-0.2	3.48	3.47	204.10	206.60	-1.21	41306	-H
Ponceau SX	Identified	435.0318	-2.0	3.54	3.54	204.37	206.95	-1.25	28237	-H
Red 2G	Identified	464.0227	-0.1	2.98	2.93	206.59	207.24	-0.31	36143	-H
saccharin	Identified	181.9918	0.2	2.00	2.02	128.58	130.71	-1.63	24507	-H
Sodium cyclam...	Identified	178.0545	0.7	2.40	2.38	136.90	138.50	-1.15	42649	-H
Sucralose	Identified	395.0068	-1.2	2.93	2.96	172.53	175.21	-1.53	28195	-H

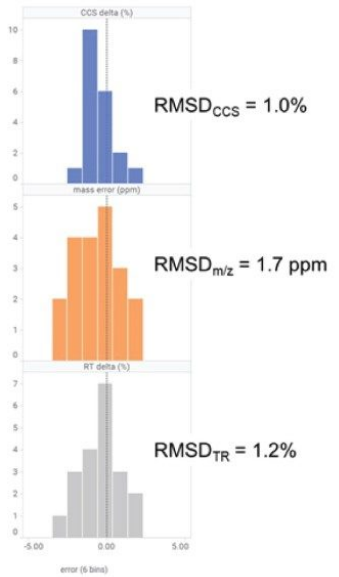


图5.向无色滋补饮料(D4)中添加额外的已授权批准/未授权批准食品添加剂的负离子 $HDMS^E$ 结果，图中显示了保留时间、精确质量数测量值，以及预期/实测的 $^{TW}CCSN_2$ 。

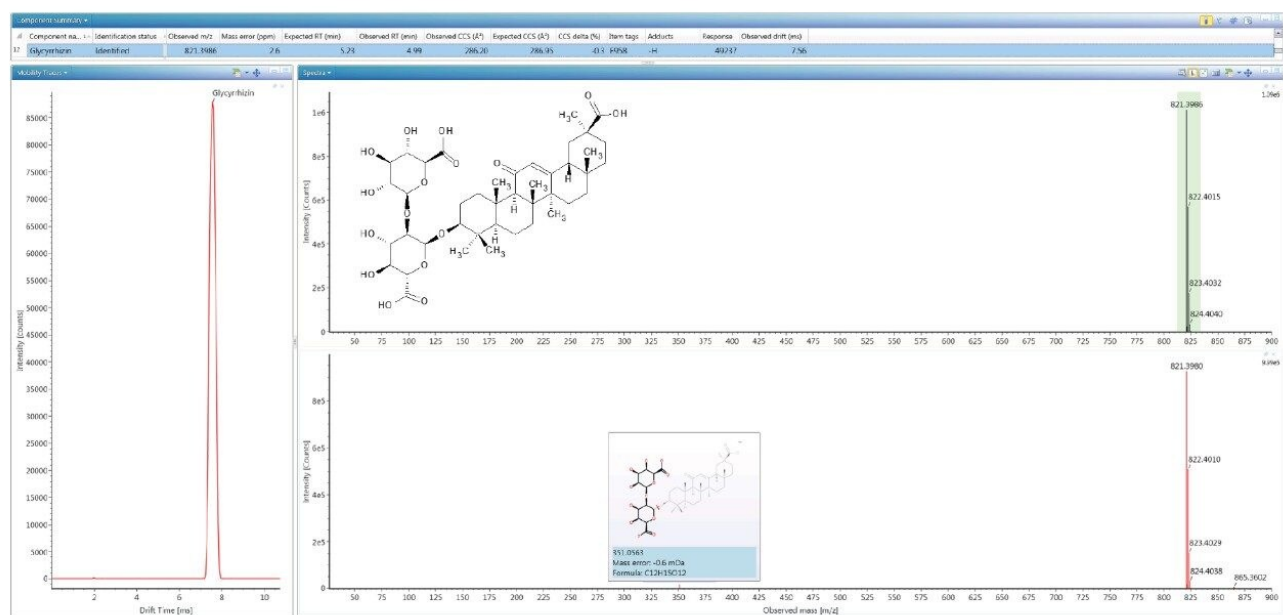


图6.向无色滋补饮料(D4)中添加未授权批准甘草甜素食品添加剂的负离子 $HDMS^E$ 母离子和离子淌度子离子谱图。

实测 $^{TW}CCSN_2=286.2 \text{ \AA}^2$ ($CCS \Delta = -0.3\%$)。

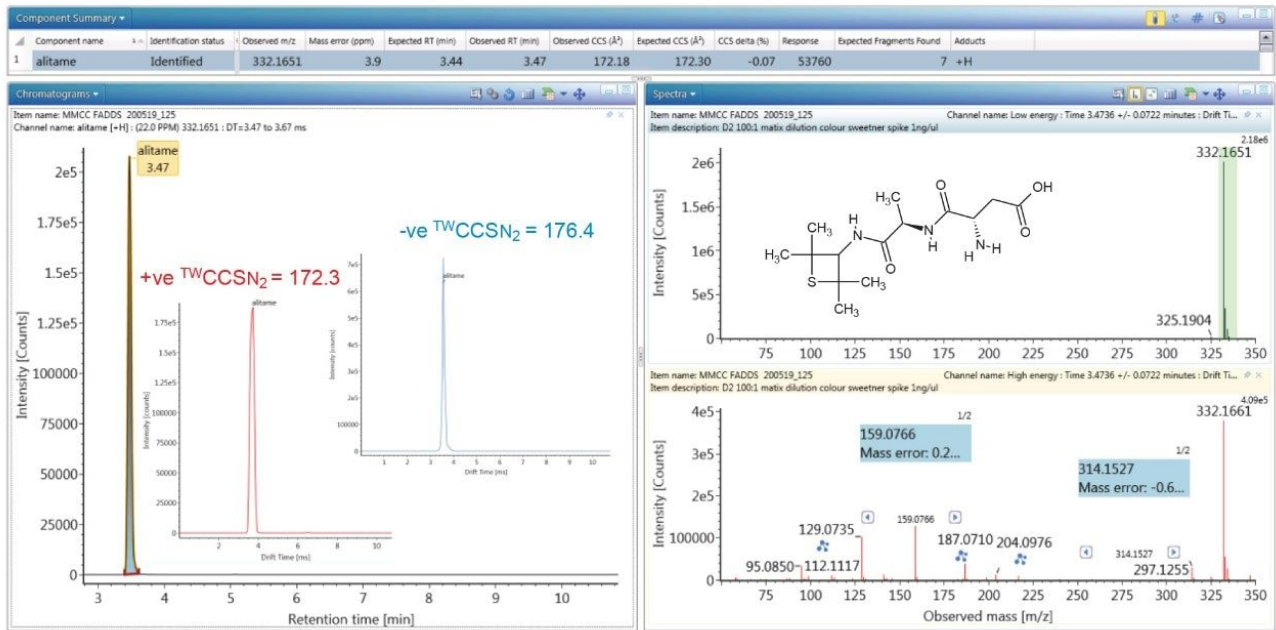


图7. 食品添加剂数据库成分阿力甜的正离子 $HDMS^F$ 母离子和离子淌度子离子谱图，显示了+ve和-ve $^{TW}CCSN_2$ 值。

结论

- 本研究应用了一种稳定的质谱数据库构建策略，来生成包含甜味剂、防腐剂、抗氧化剂和食用色素的正离子和负离子FA数据库。收集的数据包括保留时间、精确质量数、保留时间/漂移时间母离子/离子淌度子离子m/z值和CCS值。
- 该数据库构建策略结合了 $^{TW}CCSN_2$ 值的测量和使用，经证明具有良好的稳定性，所生成的数据库可用于对日常食品中的食品添加剂进行非靶向筛查。已授权批准/未授权批准的食品添加剂的阳性鉴定结果通常在2% CCS容差范围内，相比之下，MRM比率筛查容差通常为20%。
- 使用CCS作为筛查参数有可能降低采集后工作流程筛查参数的初始特异性，并减少通用提取方法对复杂基质的误检情况。
- 结合正离子和负离子模式 $^{TW}CCSN_2$ 值创建高特异性指纹图谱，有利于提高痕量检测水平的特异性。
- 本研究开发出一种针对多种添加剂的分析方法，能够分析大量FA，对于需要控管的食品具有更高的覆盖率，同时有助于评估多种FA的暴露量。

- 在灵活的筛查数据处理工作流程中，^{TW}CCSN₂与保留时间和 m/z 结合，可用作稳定可靠的鉴定指标，以提高至关重要的食品安全研究中非靶向食品添加剂筛查的鉴定可信度。

参考资料

1. Regulation (EC) No 882/2004.2. Directives 94/35/CE (Article 8), 94/36/CE (Article 6), and 95/2/CE (Article 7).
2. Directives 94/35/CE (Article 8), 94/36/CE (Article 6), and 95/2/CE (Article 7).
3. https://ec.europa.eu/food/safety/food_improvement_agents/additives.
4. Gosciny, S.; McCullagh, M. A Novel Approach to the Reduction of False Positive and Negative Identifications in Screening of Pesticide Residues in Food Analysis, Proceedings of the 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Minneapolis, MN, 2013.
5. McCullagh, M.; Gosciny, S. Discovery of Pesticide Protomers Using Routine Ion Mobility Screening. McCullagh, M.; Gosciny, S. Waters Corporation Application Note 720005028EN.2014.
6. Gosciny, S.; McCullagh, M.; Far, J.; De Pauw, E.; Eppe, G. Towards the Use of Ion Mobility Mass Spectrometry Derived Collision Cross Section as a Screening Approach for Unambiguous Identification of Targeted Pesticides in Food. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2019, p. 1–15.
7. McCullagh, M.; Wood, M.; Mistry, N.; Gosciny, S.; Douce, D.; Dalsgaard, P. Investigations into Cross-Platform and Long-Term Robustness of a CCS metric, 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA, 2019.
8. McCullagh, M.; Giles, K.; Richardson, K.; Stead, S.; Palmer, M. Investigations into the Performance of Travelling Wave Enabled Conventional and Cyclic Ion Mobility Systems to Characterise Protomers of Fluoroquinolone Antibiotic Residues. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2019; p. 1–11.
9. McCullagh, M.; Pereira, C.A.M.; Yariwake, J.H. Use of Ion Mobility Mass Spectrometry to Enhance Cumulative Analytical Specificity and Separation to Profile 6 - C/8 - Cglycosylflavone Critical Isomer Pairs and Known–Unknowns in Medicinal Plants. *Phytochemical Analysis.* 2019; p. 1–13.

10. McCullagh, M.; Douce, D.; Van Hoeck, E.; Goscinny, S. Exploring the Complexity of Steviol Glycosides Analysis Using Ion Mobility Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* 2018; 90, p. 4585–4595.
11. Goshawk, J.; Barkowitz, G.; McCullagh, M. The Development of a Natural Products Library Using Ion-Mobility Enabled Mass Spectrometry. 67th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, GA, 2019.

特色产品

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

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

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

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

Progenesis QI软件 <<https://www.waters.com/134790655>>

720006768ZH, 2020年2月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号