

应用纪要

使用离子淌度质谱分析萃取物和可浸出物的 筛查工作流程

Jane Cooper, Rachel Sanig, Gitte Barknowitz, Baiba Cabovska

Waters Corporation



摘要

由于全球法规日益严格，各行各业愈加注重萃取物和可浸出物(E&L)组分的鉴定和表征工作。典型的E&L分析工作流程包括基于组分谱库或数据库的靶向筛查步骤，其中谱库的质量是实现可靠筛查的关键因素。该工作流程还包括非靶向筛查步骤以及随后对发现的任何未知组分进行表征，此过程通常复杂而耗时，但可以通过比较和解析软件工具（例如UNIFI科学信息系统中的工具）明显改善。

高分辨率质谱(HRMS)技术非常适合在靶向和非靶向筛查分析中处理大量化合物。将离子淌度技术与HRMS结合使用，可根据大小、形状和电荷对离子进行进一步分离。此方法有助于确定离子的碰撞截面（CCS，单位为 \AA^2 ）值；该值是在气相中区分离子的特征之一，与离子的化学结构和三维构象有关。使用CCS值作为附加数据点，可提高筛查谱库的质量，从而实现更可靠的靶向筛查应用。谱图净化是离子淌度技术的另一项优势，有助于解析未知化合物谱图并确认已知化合物。

本应用纪要概述了如何在E&L工作流程中使用UNIFI科学信息系统，以便通过一站式应用同时纳入靶向筛查和非靶向筛查，以及如何创建科学库、执行二元比较并使用解析工具和其他附加工具。

优势

- 简便的LC-MS方法利用高分辨率质谱，适用于分析化妆品、食品和药品包装材料萃取物
- 采用CCS处理的常规离子淌度技术可提高靶向筛查和鉴定的可信度
- UNIFI科学信息系统软件提供定制的工作流程，可精简未知化合物的结构解析过程

简介

产品包装或接触材料由不同的化学物质制成，其中可能包括聚合物、聚合物添加剂（例如抗氧化剂、滑爽剂、着色剂及其他化合物）。这些化学物质、其杂质和降解产物可能迁移到原本要保护的消费品中；造成食品、药品、化妆品、药物输送系统、可植入医疗器械及其他产品中加入有害和可能不安全的物质。

由于全球法规日益严格，各行各业愈加注重萃取物和可浸出物(E&L)组分的鉴定和表征工作¹⁻⁷。典型的E&L分析工作流程最初从靶向筛查步骤开始。筛查工作基于组分谱库或数据库进行，即根据精确质量数、保留时间和碎片质量数据比对化合物。这些谱库的质量对于实现可靠的筛查应用至关重要。该工作流程中的下一步是非靶向筛查步骤，以及随后对发现的任何未知组分进行表征。这一步通常复杂而耗时；但是，借助比较和解析软件工具可以明显提升速度。

高分辨率质谱(HRMS)技术非常适合在靶向和非靶向筛查分析中处理大量化合物。将离子淌度质谱(IMS)与HRMS结合使用，可以在离子漂移穿过淌度池中的气体时根据其大小、形状和电荷将其进一步分离。可使用离子通过IMS设备的漂移时间来确定其碰撞截面（CCS，单位为 \AA^2 ）。CCS是在气相中区分离子的一项重要特征

，与离子的化学结构和三维构象有关。使用CCS值用作附加数据点，可进一步改善这些谱库的质量以实现靶向筛查⁸。谱图净化是IMS技术的另一项优势，有助于解析未知化合物谱图并确认已知化合物⁹。

本应用纪要概述了一种简单的工作流程，包括通过一站式应用同时进行靶向筛查和非靶向筛查，以及科学库创建、二元比较、解析及其他工具。还介绍了在萃取物和可浸出物筛查应用中使用Vion IMS QTof（图1）进行离子淌度分析的优势。



图1.Vion IMS QToF质谱仪

实验

样品前处理

样品萃取物的制备方法如下：将包装材料切成5 mm²的小块，在45 °C的平均温度下将1 g小块置于10 mL 2-丙醇中超声处理9 h。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-ClassFTN
色谱柱:	CORTECS C ₁₈ , 90Å, 1.6 μm, 2.1 mm X 100 mm (部件号: 186007095)
柱温:	40 °C
进样体积:	1 μL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	1 mM乙酸铵水溶液 + 0.1%乙酸
流动相B:	甲醇
梯度:	流动相梯度详见表1

梯度

时间 (min)	%A	%B	曲线
0.0	98	2	初始
0.5	98	2	6
6.0	1	99	6
12.0	1	99	6
12.1	98	2	6
14.0	98	2	6

表1.ACQUITY UPLC流动相梯度

MS条件

MS系统:	Vion IMS QTof
电离模式:	ESI+, ESI-
采集模式:	HDMS ^E
采集范围:	50-1500 <i>m/z</i>
扫描时间:	0.2 s
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	500 °C

脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气流速:	50 L/h
参比质量数:	亮氨酸脑啡肽, [M+H] ⁺ <i>m/z</i> 556.276
毛细管电压:	0.6 kV
碰撞能量:	ESI+ 低能量: 6 eV 高能量梯度: 由20 eV增加至40 eV ESI- 低能量: 6 eV 高能量梯度: 由30 eV增加至70 eV

数据管理

色谱软件:	UNIFI科学信息系统1.9.4版
MS软件:	UNIFI科学信息系统1.9.4版
信息学软件:	UNIFI科学信息系统1.9.4版

分析方案

在分析前、分析过程中和分析后,使用分段标准品检查已鉴定组分的质量精度和CCS值。将已鉴别化合物的可接受标准设定为:质量精度≤3% ppm, CCS变化≤2%。

本分析使用了两种不同的系统适应性混标: CCS值已知的沃特世LC-MS QC参比标准品(部件号: [186007362](https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186007362-quad-lcms-qc-reference-material.html) <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186007362-quad-lcms-qc-reference-material.html>>)和沃特世E&L系统适应性混标(部件号: [186008063](https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186008063-extractables--leachables-screening-standard.html) <<https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/standards--reagents/186008063-extractables--leachables-screening-standard.html>>)¹⁰。E&L标准品包含18种化合物,这些化合物代表常见的工业聚合物添加剂和防腐剂,涵盖广泛的质量范围,还包括在负离子ESI模式和正离子ESI模式下电离的化合物。

结果与讨论

本研究创建了针对特定应用的UNIFI谱库用于靶向筛查E&L化合物，其中包含100多个条目。一开始先在谱库中填充各组分的关键信息，包括化合物名称、IUPAC名称、标签及相关的.mol文件。然后用实验得到的标准品分析结果进行补充。

针对100多种典型E&L化合物制备包含油墨、染料、抗氧化剂和UV过滤剂中常见化合物的标准储备液，集中混合（每种混合物中包含9~10种化合物）。使用实验部分概述的方法，将两个浓度水平（5 ppm和0.5 ppm）的混标进样分析7次。根据生成的结果（表2），将平均CCS和保留时间值导入UNIFI库中。还将其他加合离子和碎片离子信息发送至分析的各谱库组分的科学库（图2）。若各谱库组分均拥有大量准确的信息，即可减少靶向筛查分析期间的假阳性结果数量，从而有助于提高用户对靶向组分鉴定的信心。

组分名称	中性质量数 (Da)	tR (分)	%RSD tR	平均质量误差 (ppm)	平均 CCS	%RSD CCS	加合物	ESI +ve 或 -ve
羟苯甲酯	152.0473	3.63	0.21	1.09	126.26	0.18	-H	-ve
羟苯丙酯	180.0786	4.65	0.14	0.94	140.69	0.1	-H	-ve
邻苯二甲酸二乙酯	222.0892	4.76	0.15	0.28	159.54	0.25	+Na	+ve
Tinuvin P	225.0902	6.15	0.11	0.6	146.81	0.12	+H	+ve
癸二酸二丁酯 (DBS)	314.2457	6.49	0.08	0.86	196.83	0.11	+Na	+ve
				-	188.18	0.1	+H	
				-	199.34	0.21	+K	
				-	199.29	0.17	+Li	
邻苯二甲酸二苯酯	318.0892	5.62	0.11	-0.16	181.74	0.18	+Na	+ve
				-	180.28	0.24	+K	
				-	185.52	0.64	+Li	
Irgafos 168	646.4515	10.71	0.17	0.45	283.57	0.23	+H	+ve
				-	281.32	0.33	+Na	
					286.45	0.62	+K	

表2.在针对本研究创建的E&L库中选择化合物时，生成的平均CCS和保留时间数据

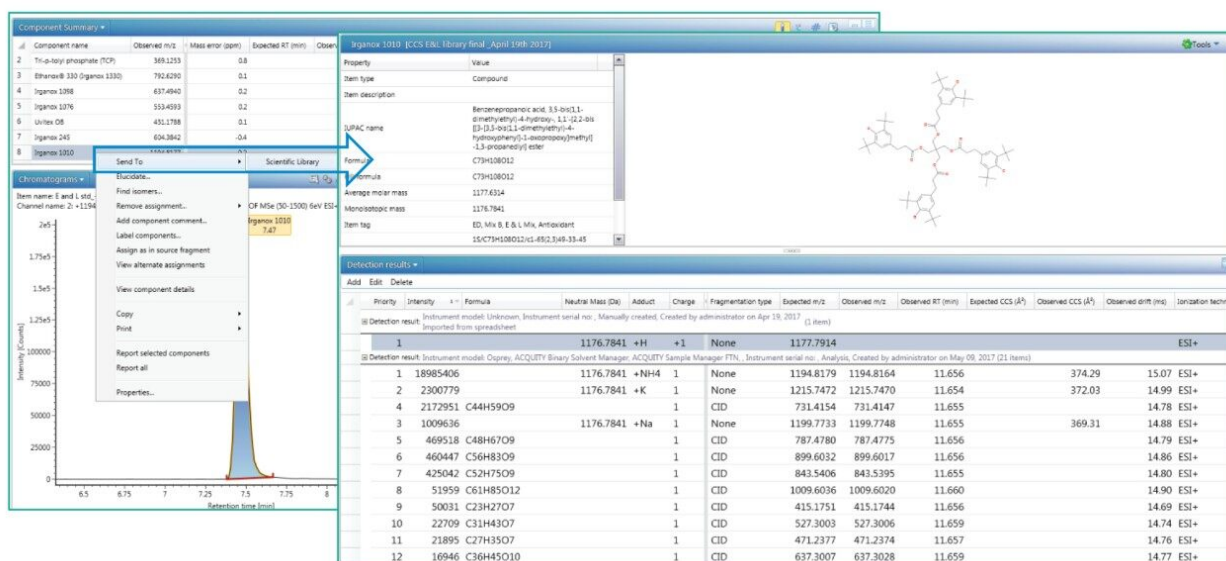


图2.发送至E&L科学库的加合离子和碎片离子信息示例：Irganox 1010。右侧为UNIFI中的谱库条目布局，其中包括实测CCS、保留时间值、电离模式信息和加合离子。

UNIFI工作流程

工作流程由一系列步骤组成，这些步骤专为实现整个数据集的全面可视化而设计，以使用户以少量用户干预即可轻松获取制定决策所需的信息。在UNIFI中，用户可以使用根据用户自身要求定制的工作流程定义如何处理和显示数据。创建针对特定E&L方法分析的典型示例见图3，其中一个工作流程包括多个步骤，可根据用户需求进一步定制。本文介绍以下步骤：系统适应性审查；根据开发的谱库审查已鉴定组分（靶向筛查）；使用二元比较鉴定未知化合物（非靶向筛查）；结构解析发现工具。使用实验部分概述的方法分析样品。

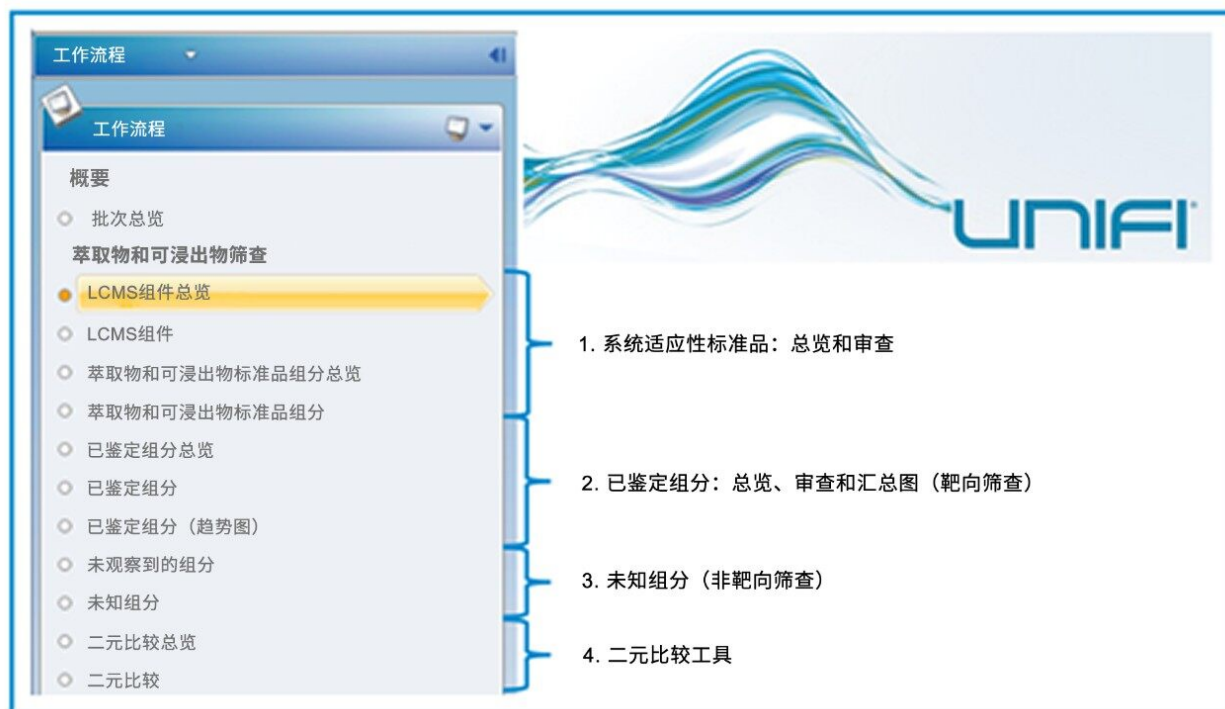


图3.可定制的UNIFI工作流程示例，突出显示了可以在一种工作流程中采用的不同技术以及查看数据的不同方式。

1. 系统适应性标准品总览和审查

该UNIFI示例工作流程的第一步有助于审查和接受系统适应性标准品，检查整个系统的性能。可以在组分总览图（见图4）或组分汇总中查看数据。

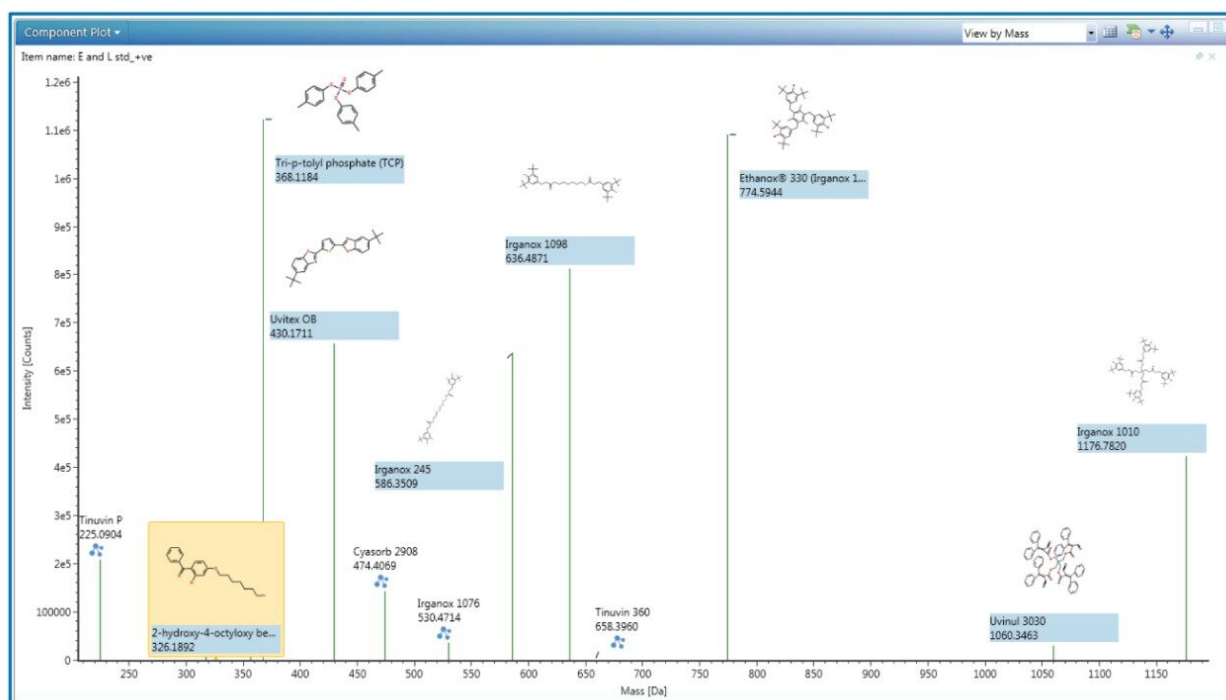


图4.分析用于检查系统性能的E&L系统适应性标准品得到的组分总览图

2. 已鉴定组分总览、审查和汇总图

UNIFI工作流程的下一阶段包括的步骤有助于审查和接受通过UNIFI科学库比对进行靶向筛查分析鉴定的组分。这些结果可以在组分总览图或组分汇总中查看（图5）。务必使用多个鉴定点，有助于避免假阳性结果并提高鉴定结果的可信度，缩短审查结果所需的时间。精确质量数、保留时间、碎片离子和CCS均可用作靶向筛查的鉴定点。

使用离子淌度质谱获得的CCS值可作为额外的鉴定点，有助于减少假阳性结果。与保留时间不同，CCS值不受流动相、色谱柱等因素改变或基质效应的影响。此外，在仅靠精确质量数无法分离异构体的情况下，CCS值可用于分离和鉴定任何异构体。因此，将CCS值添加到萃取物和可浸出物筛查库中，有助于成功完成靶向筛查。

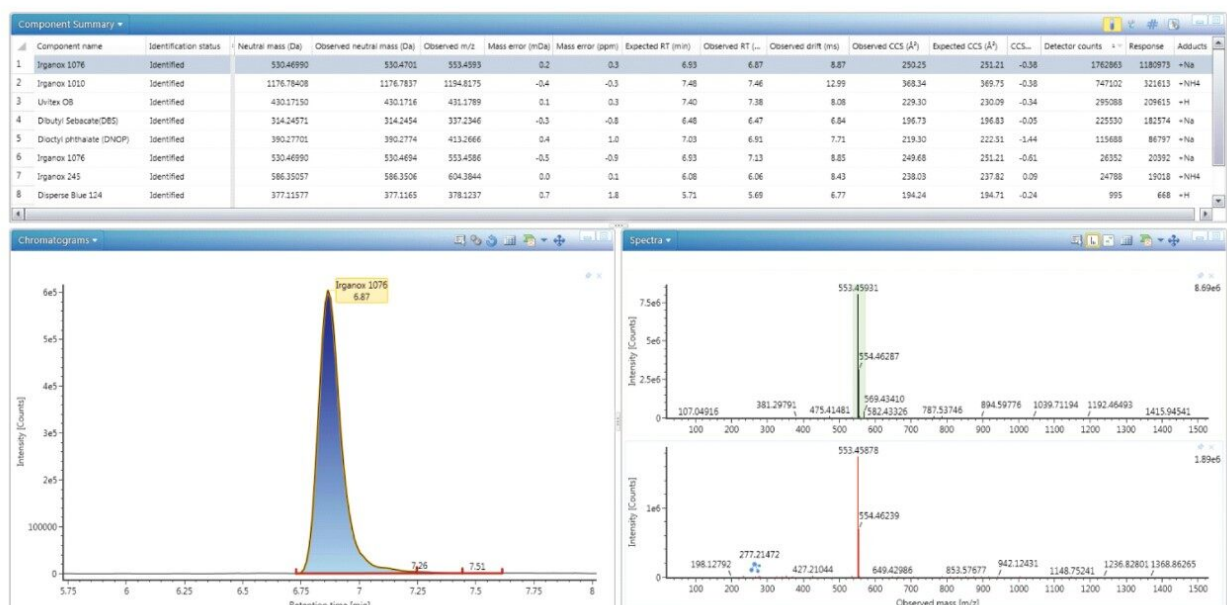


图5.提取样品中已鉴定组分汇总视图。该视图可根据用户需求自行定义。此处显示了已鉴定组分汇总表以及所选组分的色谱图和质谱图。

除此以外，利用CCS进行筛查的另一项优势包括通过组分的保留时间和离子淌度漂移时间对齐组分时所获得的谱图清晰度，使谱图易于查看并同时鉴定母离子和碎片离子（图6）。由于去除了具有不同离子淌度漂移时间的色谱共流出物，低能量和高能量谱图均变得更清晰；且碎片离子与其母离子的漂移时间在离子淌度维度上一致，因此更易于将碎片离子与其母离子关联起来。

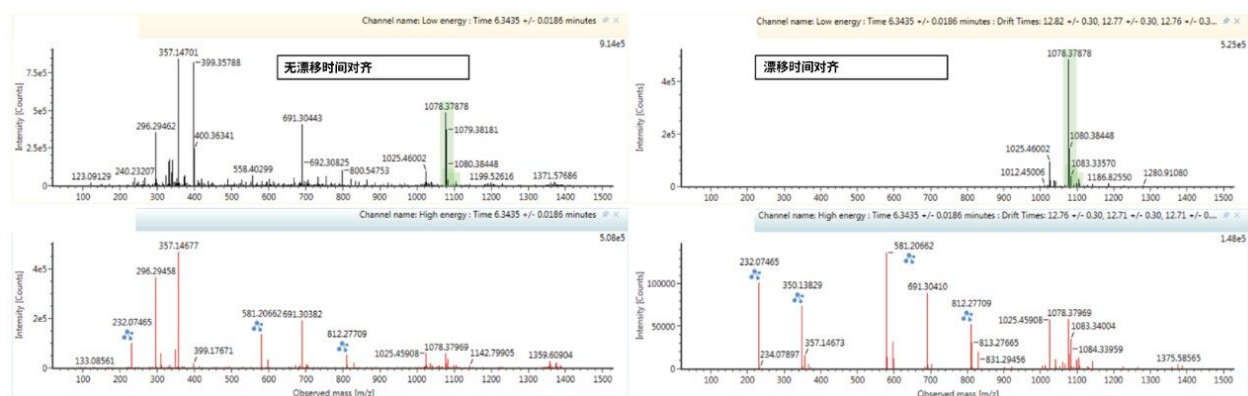


图6. E&L混标中Uvinul 3030的低能量和高能量谱图。左图是未应用漂移时间对齐时得到的谱图，右图是采用漂移时间对齐后得到的更清晰的谱图。

在UNIFI中查看数据的另一种方式是采用汇总图功能，该功能使用户能够在运行的所有进样中查看所选组分的结果趋势（图7）。可汇总组分的任何结果，例如CCS、精确质量数、保留时间或响应。

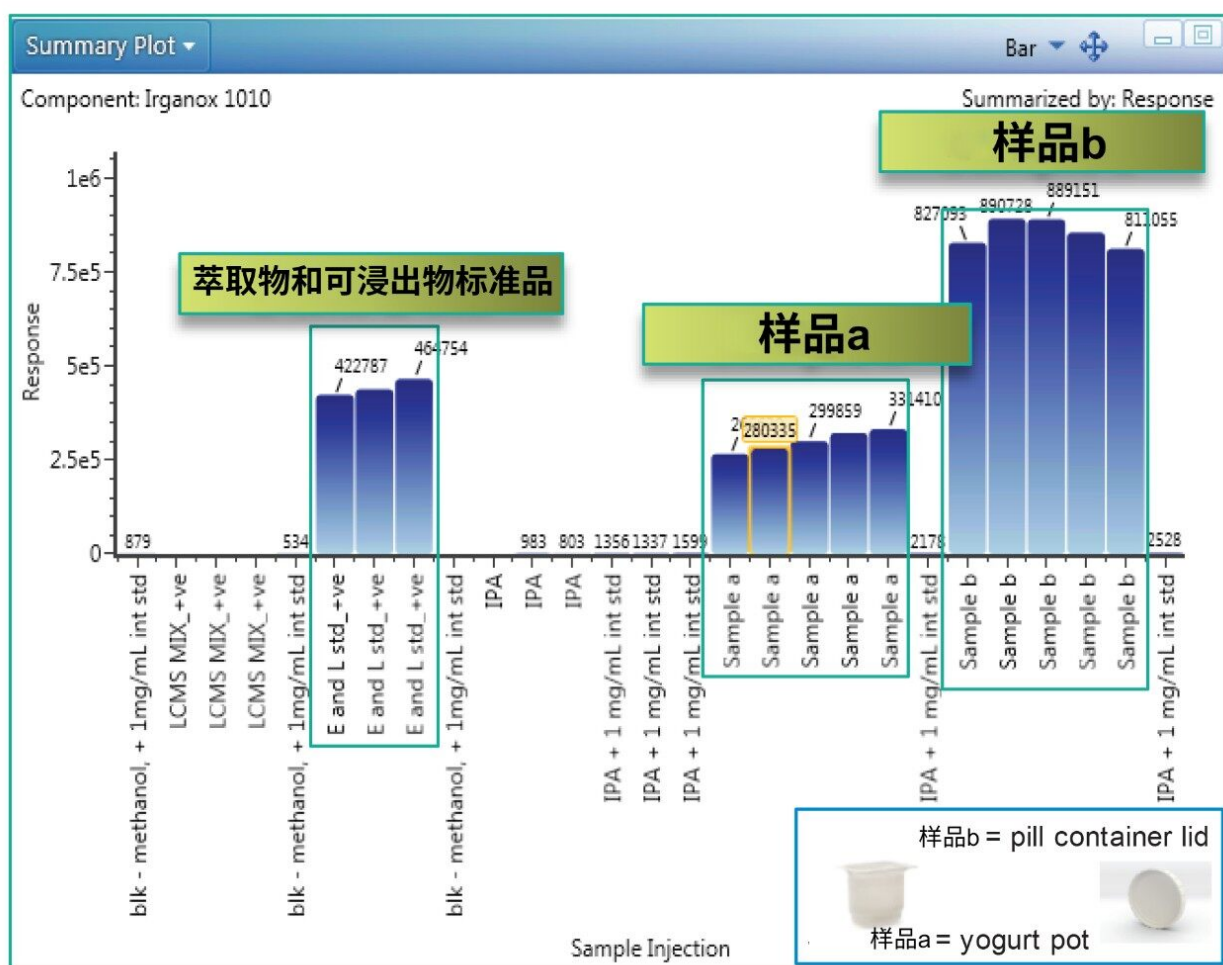


图7.在E&L标准品和两个不同样品（a和b）中鉴定出的Irganox 1010响应的汇总图

3. 未知组分审查

鉴定UPLC色谱图中的未知峰是E&L分析实现样品完整表征的关键一环。在创建的这一工作流程中，采取两个步骤审查数据。第一步是查找并列未知组分（图8）。



图8.列为萃取样品候选质量数的未知组分

第二步是使用二元比较。UNIFI软件的这一功能使分析人员可以直接比较分析物样品和参比空白萃取物的结果，识别重要差异。可以将样品中特有的或样品中含量较高的组分轻松显示在组分汇总中以实施进一步审查（图9）。这是一项重要的E&L分析工具，通常可观察到E&L型化合物的背景水平。此工作流程主要强调二元比较，但是当需要统计比较时，也可以使用多变量分析包。

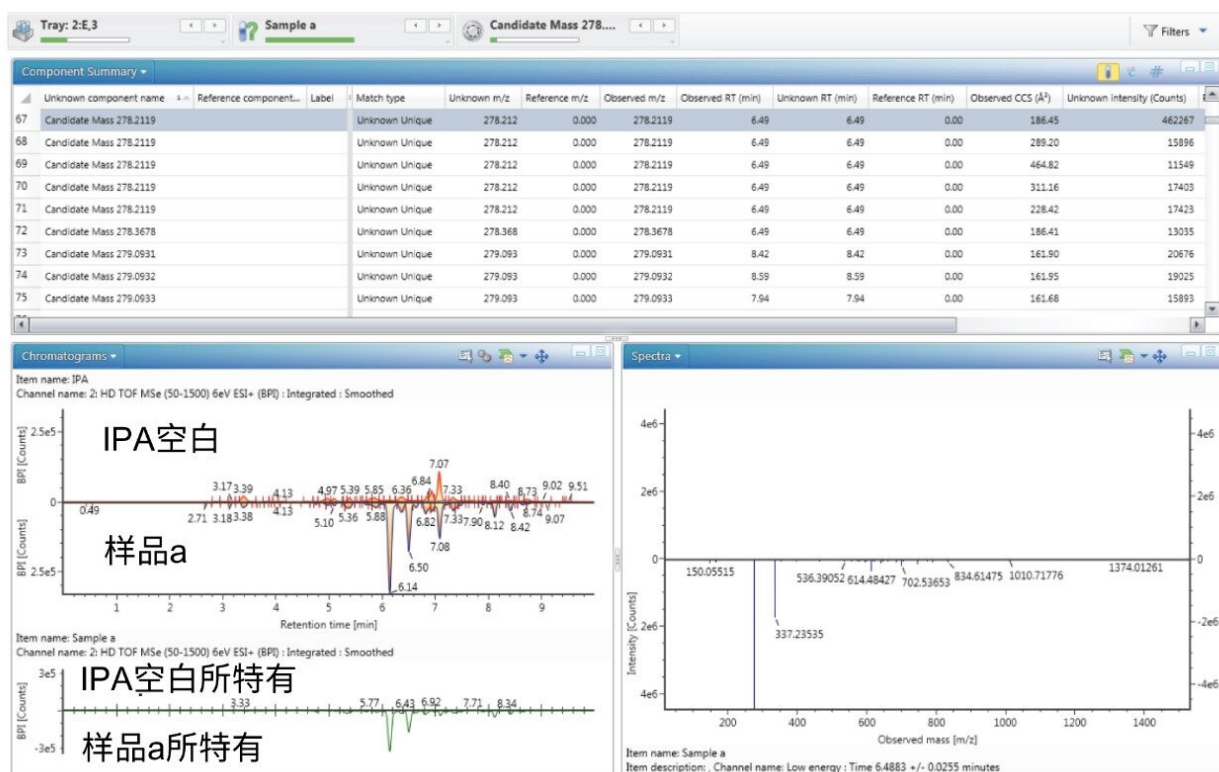


图9.对样品和参比空白(IPA)进行二元比较后，将样品中观察到的化合物列为候选质量数。此处显示的比较图为基峰强度色谱图，但可以根据用户要求自行定义。

4. 解析工具集

发现未知组分后，分析人员可以使用UNIFI的发现工具通过“解析工具集”直接在工作流程中鉴定组分¹¹（如图10所示）。该工具集包含元素组成计算器，可为精确质量数峰确定最可能的化学式。利用i-FIT算法，根据公式的理论同位素模式与谱图中峰簇相匹配的可能性以及高分辨率精确质量测量结果对每个化学式进行评分。然后，软件使用预测的元素组成对结构进行数据库搜索，例如在ChemSpider中进行搜索。接下来对发现的结构进行模拟碎裂，以寻找理论碎片与观察到的高能量离子的匹配结果。然后显示初步结果供用户评估。要实现100%匹配，需使用参比标准品。但是，UNIFI软件可大幅节省分析人员在解析过程中投入的时间。

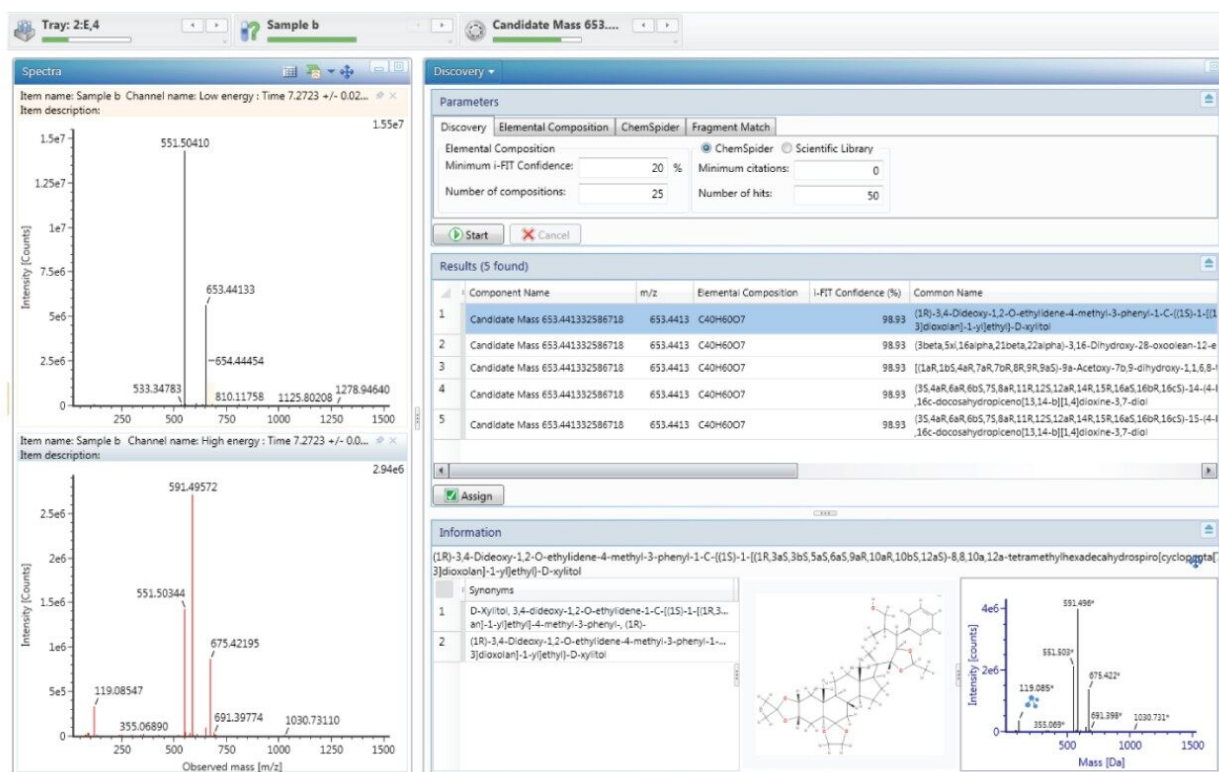


图10.UNIFI发现工具，用于鉴定样品中的未知峰

5. 其他工具

在UNIFI E&L筛查工作流程中还可以使用其他步骤，本文未作介绍。例如定量步骤，用已知标准品创建校准曲线，然后对所分析样品中组分进行定量¹²。此外，UNIFI工作流程包括自定义报告工具，旨在显示用户所需的数据及其他信息。图11展示了使用沃特世LC-MS QC参比标准品进行系统适应性测试得到的报告。

Analysis Information

Item name: 2 A: E and L METHOD 12th May 2017 +ve
 Version: 3
 Modified date: Jun 02, 2017 10:40:08 GMT Daylight Time
 Modified by: Administrator, UNIFI
 Folder: Company/E and L

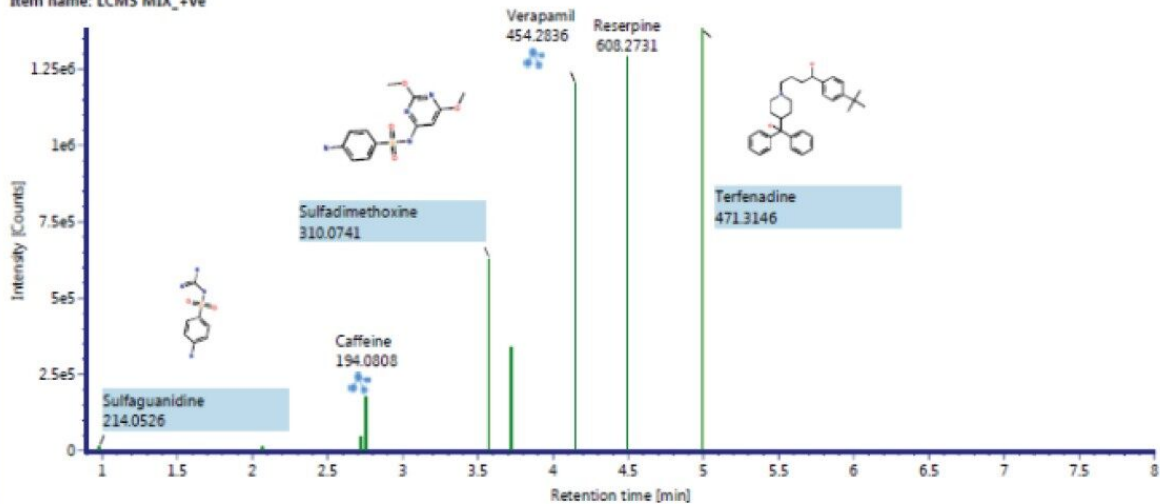
Analysis Method Item name: E & L METHOD 11th May 2017 +ve
 Analysis Method Version: 3
 Sample Set Created date: May 13, 2017 01:10:54 GMT Daylight Time
 Sample Set Instrument system name: Vion, SM-FTN and BSM
 Sample Set Instrument system type: Osprey, ACQUITY Binary Solvent Manager, ACQUITY Sample Manager FTN.

Sample Information

Item name: LCMS MIX_+ve
 Item description:
 Acquisition start time: May 13, 2017 01:23:58 GMT Daylight Time
 Sample type: Unknown
 Sample position: 1.D.2
 Acquisition time: 10.00

E Cord ID: 01303626315346

Item name: LCMS MIX_+ve



Item name: LCMS MIX_+ve, Sample position: 1:D,2, Replicate number: 1

	Component name	Observed RT	Expected CCS (Å ²)	Observed CCS (Å ²)	CCS delta (%)	Observed m/z	Mass error (ppm)	Adducts	MS Response
1	Acetaminophen	2.07	130.40	128.09	-1.77	152.0706	0.21	+H	11541
2	Caffeine	2.76	138.20	135.55	-1.92	195.0880	1.97	+H	175643
3	Reserpine	4.49	252.30	253.32	0.41	609.2803	-0.51	+H	1290000
4	Sulfadimethoxine	3.57	168.40	168.22	-0.11	311.0813	1.54	+H	629253
5	Sulfaguanidine	0.98	146.80	144.82	-1.35	215.0599	0.80	+H	13567
6	Terfenadine	4.99	228.70	233.08	1.91	472.3219	1.93	+H	1381480
7	Val-tyr-val	2.73	191.70	194.10	1.25	380.2182	0.57	+H	43847
8	Verapamil	4.15	208.80	212.55	1.80	455.2909	1.00	+H	1202652

图11.UNIFI LC-MS系统适应性标准品报告

结论

UNIFI E&L筛查工作流程为分析人员提供了一套用户自定义的成熟工作流程，有助于浏览复杂的数据。使用一个集成平台即可完成数据采集、处理和结果报告，缩短从样品分析到报告结果的时间。通过一站式应用即可完成靶向筛查和非靶向筛查，同时还允许用户执行额外的步骤，例如科学库创建、数据比较以及完成特定工作流程所需的结构解析。

科学库应用程序能够快速对工作流程中的条目进行数据库比对搜索。用户可以根据 m/z 、保留时间、CCS和碎片离子信息进行准确、可靠的搜索。基于信息学的结构解析发现工具能够快速评估未知组分的信息。

离子淌度质谱技术为复杂样品的分离提供了额外的维度，还可以生成CCS值。对于萃取物和可浸出物的分析，靶向筛查的附加数据点有助于减少假阳性结果并提高鉴定的可信度。应用漂移时间对齐获得的谱图清晰度使离子鉴定更容易，有助于解析未知化合物谱图和确认已知化合物。

参考文献

1. Food and Drug Administration, 2000, Code of Federal Regulation Chapter 21.
2. Official Journal of the European Union, 2004, Regulation 1935/2004/EC.
3. Official Journal of the European Union, 2006, Regulation 2023/2006/EC.
4. Official Journal of the European Union, 2011, Regulation 10/2011/EU.
5. Official Journal of the European Union, 2006, Regulation 1907/2006/EC.
6. Official Journal of the European Union, 2009, Regulation 2009/49/EC.
7. Official Journal of the European Union, 1987, Directive 87/357/EEC.
8. The Use of Collision Cross Section (CCS) Measurements in Food and Environmental Analysis, Technical Note [720005374EN](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005374en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005374en.pdf>> , 2015.
9. Using Ion Mobility for Enhanced Spectral Cleanup in Food and Environmental Analysis, Technical Note [720005375EN](https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005375en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005375en.pdf>> , 2015.
10. Extractables & Leachables Screening Standard.Care and Use Manual [720005660EN](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720005660en.pdf) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/720005660en.pdf>> .October 2016.

11. Screening Workflow for Extractable Testing Using the UNIFI Scientific Information System, Technical Note [720005688EN](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005688en.pdf>> , April 2016.
12. Quantitation of High Resolution MS Data Using UNIFI: Acquiring and Processing Full Scan or ToF-MRM (Targeted HRMS) Datasets for Quantitative Assays, Application Note [720005605EN](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005605en.pdf>> , 2016.
-

特色产品

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

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

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

离子淌度质谱 <<https://www.waters.com/134656158>>

基于UNIFI的筛查平台解决方案 <<https://www.waters.com/134682903>>

720006988ZH, 2020年8月