

使用 GC Orbitrap 气相色谱高分辨质谱联用仪表征食品包装中的未知物

作者: Dominic Roberts¹, Jesus Varela², Yves-Alexis Hammel² 和 Paul Silcock¹
¹Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK
²Nestle, Lausanne, Switzerland

关键词

食品包装, Q Exactive GC, Orbitrap 质谱, 未知物鉴定, 结构解析, 食品安全

简介

对食品进行包装的主要目的是在保证保质期内包装食品的质量。毋庸置疑, 食品包装是确保安全食品供应链中不可或缺的重要环节。若包装不能起到适当的屏障作用, 食品生产者和制造商迟早会面对可能造成严重健康威胁的重大微生物或化学食品安全事故。然而从另一方面来说, 众所周知, 食品包装中使用的化学成分也有可能迁移到食品当中, 造成更大的威胁。¹ 食品和饮料可能与它们接触到的任何表面发生强相互作用, 从而有可能影响产品的品质。² 例如包装内的食物或饮料可能对包装材料具有腐蚀性或者会引起包装材料的物理性损坏, 进而导致包装材料中的化学成分泄漏至食品当中。不幸的是, 没有完全“惰性”的包装材料: 玻璃、纸张、塑料和陶瓷等材料都可能发生浓度可观的化学成分泄漏。因此, 食品生产商和监管机构必须理解食品包装可能带来的健康风险、进行监控, 并采取措施使消费者的风险降至最低。



气相色谱-质谱 (GC-MS) 是一种非常常用的分析技术。由于它具有色谱分离度高、重复性好、峰容量大等优点, 更为重要的是, 能够借数据量巨大的商业谱图库进行化合物鉴定识别, 该方法已广泛用于食品包装研究。由于被分析物本身通常是挥发或半挥发性的化合物 (< 1000 Da), 所以特别适合 GC-MS 分析。食品包装中的主要材料, 如高分子材料的单体、助剂和溶剂的情况已研究的比较清楚, 不过这些材料中有可能含有一些非故意添加的物质 (non-intentionally added substances, NIAS) 比如杂质、中间体、高分子材料或添加剂的降解产物, 以及回收再利用时带入的污染物等。

在分析食品包装中的 NIAS 时, 面临的最大挑战在于研究者对于可能涉及的化学物质情况一无所知。因此, 所选分析方法的选择性必须尽可能低, 以便最大化地采集化合物

信息。为了实现这个目标，样品提取技术必须尽量通用，经常只包含简单的液相萃取和浓缩操作。样品制好后首先会进行全扫描分析，以便得到高覆盖率的样品信息。如果仅使用低分辨率 GC-MS 仪器进行未知物分析，操作程序会相当复杂、耗时、成本更高，因为解谱耗费的时间太长，而所得任何结果的可信度都很低。此外，由于目前需要实现样品提取和浓缩的制备和前处理过程很复杂，严重影响结果产出的耗时，因此迫切需求高分辨高灵敏度的分析手段。

本研究聚焦于使用新型的高分辨率、准确质量 GC-MS 系统对食品包装中的未知化合物进行快速、可靠的鉴定。在本研究之前，未知化合物的初步分析是借助单位质量分辨仪器（单四极杆 GC-MS）进行的，其结果在确定元素分子式、结构式和实现可靠的化合物鉴定等方面都有非常大的局限性。实现可靠元素组成鉴定、结构解析、和排除共洗脱化合物等分析目标，均需要质谱实验结果具有高特异性和高质量准确度，因此进行全扫分析和高质量分辨率 MS/MS 实验非常重要。高分辨、准确质量色质联用仪辅以实现自动谱图解析和化合物鉴定的新型软件，将为快速、可靠和全面的表征食品包装样品中的化合物提供有力工具。

实验条件

样品前处理

本研究涉及的样品是一个内部经过涂层处理的锡罐。对内部涂层使用 300 mL 己烷：丙酮（1:1）混合液在室温下浸泡 16 小时进行提取，再将 300 mL 提取液浓缩至约 1 mL，然后转移至棕色钳口样品瓶中进行分析。

仪器和方法设置

本研究中所有实验均使用 Thermo Scientific™ Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS 混合四极杆 -Orbitrap 质谱仪进行。进样使用 Thermo Scientific™ TriPlus™ RSH 自动进样仪，色谱分离使用 Thermo Scientific™ TRACE™ 1310 GC 系统和 Thermo Scientific™ TraceGOLD TG-5SiIMS 30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm 薄膜毛细管柱，前置 10 m 保护柱（P/N 26096-1421）。仪器参数和其它细节参见表 1 和表 2。

表 1. GC 和进样器条件。

TRACE 1310 GC 系统参数	
进样体积 (μL)	1
衬管	单鹅颈管 P/N 453A0344-UI
进样口类型和温度 (°C)	SSL 280
载气和流速 (mL/min)	He, 1.3
Oven 温度 Program	
温度 1 (°C)	40
保留时间 (min)	0.5
温度 2 (°C)	325
升温速率 (°C/min)	5.5
保留时间 (min)	12

表 2. 质谱仪条件。

Q Exactive GC 质谱仪参数	
传输线温度 (°C)	280
离子化类型	EI/PCI
离子源 (°C)	230 EI/190 CI
电子能量 (eV)	70
采集模式	全扫描
质量范围 (Da)	50-700
分辨能力 (FWHM at m/z 200)	120,000
锁定质量，柱流失物 (m/z)	207.0323

Q Exactive GC 系统在 EI 全扫模式下运行，分辨率为 120,000 (FWHM at m/z 200)。其它实验在正化学源模式 (PCI) 下进行，使用甲烷作为反应气，流速为 1.5 mL/min。这些实验能够提供关于分子离子的信息并辅助未知物谱峰的识别。

数据处理

数据采集使用 Thermo Scientific™ TraceFinder™ 软件进行。该软件平台整合了仪器控制功能、方法开发功能、以及定性和定量工作流程。此外，TraceFinder 还包含准确质量谱图解析和谱图匹配功能，能够最大限度满足用户需求。结构解析则使用 Thermo Scientific™ MassFrontier™ 谱图解析软件完成。

结果与讨论

本研究采用非定靶全扫描数据采集方法，在电子电离 (EI) 和正化学电离 (PCI) 模式下分析食品包装样品，并鉴定高丰度谱峰。此外，另一研究目标是为用单位质量分辨 GC-MS 检测出的质谱峰提供结构信息，因为原有结果不可能用于化合物鉴定和确认。

提取关键色谱峰 (features)

对样品进行全扫描质谱图采集, 总离子流图 (TICs) 参见图 1。Q Exactive GC 系统能够在很大的动态范围内采集准确质量数据, 当研究目标是在类似食品包装提取液这样的复杂样品中实现未知物峰的可靠鉴定时, 仪器的这一性能特征就是强有力的支持。分析的第一步是提取值得研究的谱峰, 虽然在 TIC 里能够看到所有谱峰, 对数据进行特征色谱峰提取还是至关重要。

谱峰提取的第一步是用 TraceFinder 对数据进行一轮高分辨准确质量解析以便检测到所有信噪比超过 100:1 的谱峰, 并且在解析过程中确保只有最大离子强度出现在同一保留时间的离子可以留下来进入谱图匹配阶段。通过使用这些筛选条件, 在食品包装样品中提取到 961 个特征峰 (谱峰簇)。图 2 所示为 2-羟基-5-甲基-1,3-苯二甲醛的一个谱峰例, 以及谱峰覆盖的扫描数、准确质量和 ppm 差异。

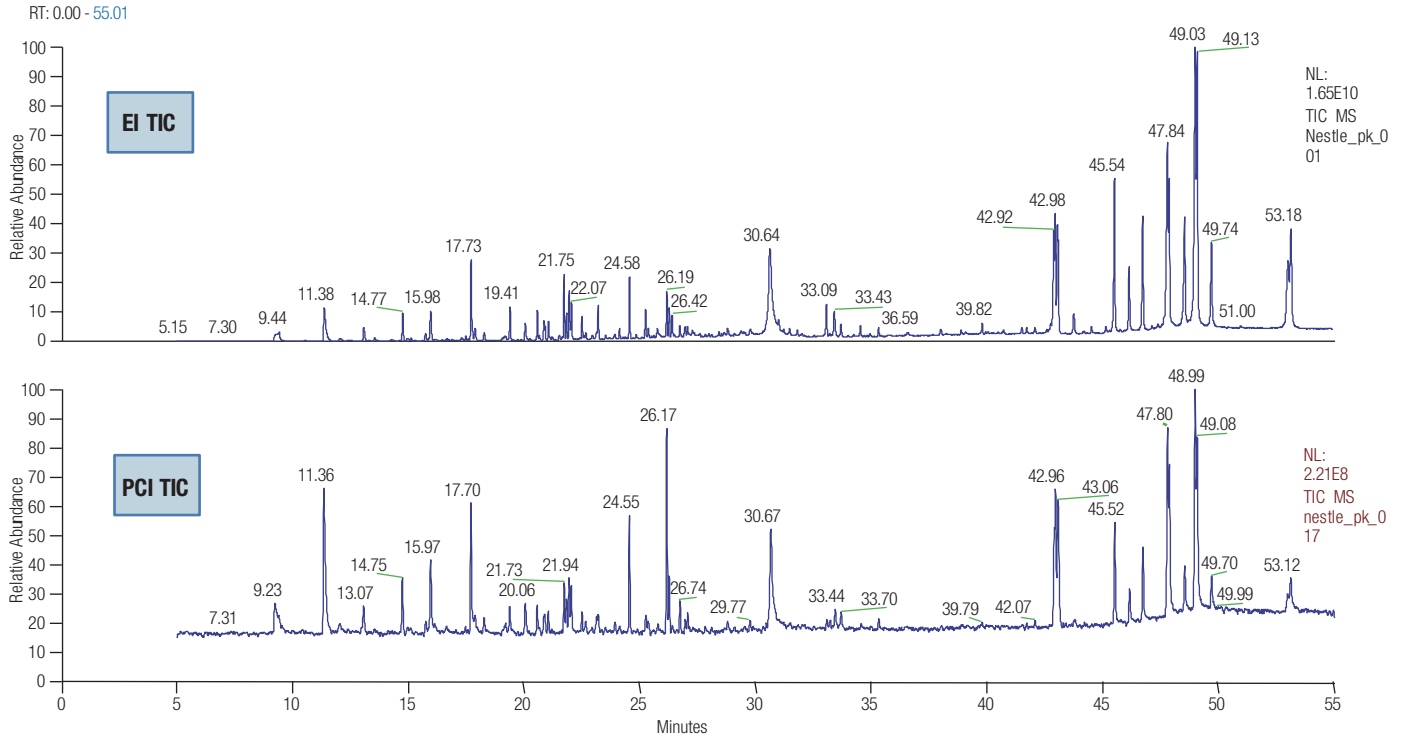


图 1. 包装样品的 GC-MS 电子电离 (EI) 和正化学电离 (PCI) 总离子流谱图 (TIC)。

RT:15.86 - 16.08

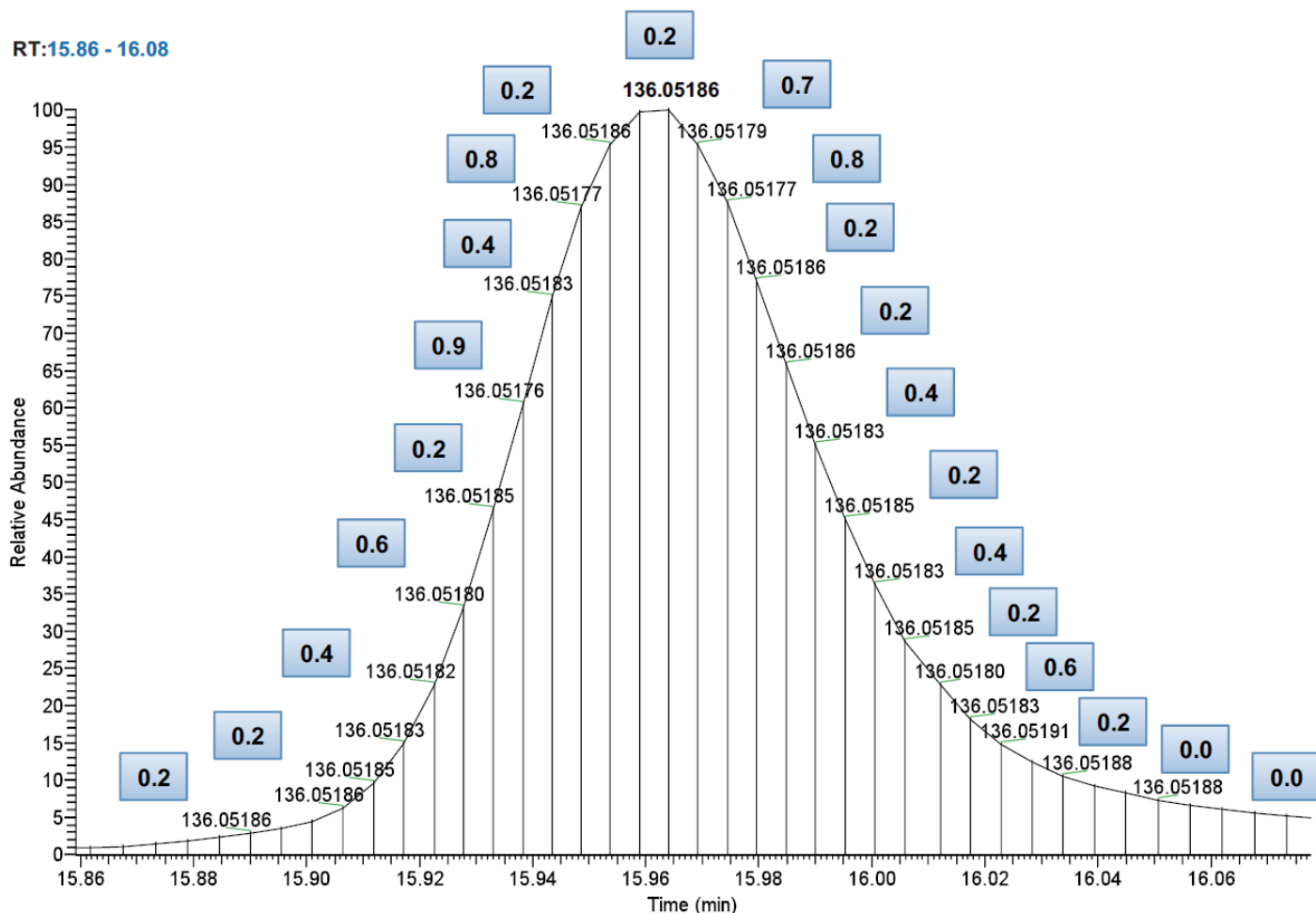


图 2. 包装样品中化合物 2-羟基-5-甲基-1,3-苯二甲醛碎片 (m/z 136.05188 \pm 5 ppm 质量窗口) 的提取离子流图, 34 扫描/峰。数据采集在全扫描模式下进行, 分辨率为 120,000 FWHM。可见每个扫描的准确质量稳定性都极佳, 质量偏差均已标注 (单位为 ppm)。

加速已知化合物鉴定

在进行了谱峰提取之后, 首先用已解析的谱图搜索商用谱图库 (NIST 2014)。若有内部库或精确质量谱图库也可进行检索。检索结果列表会根据正匹配指数 (SI) 得分和高分筛选因子 (HRF) 值进行综合评分。HRF 值是谱库检索中碎片离子精确质量合理解释的质谱图内容的百分比数值。³

综合准确质量和所得谱图中可被解释的离子的百分比能够为化合物鉴定提供一条快速、可靠的途径。使用精确质量信息使得用户不必再面对一长串既难以证实、又无法排除的谱图检索所得化合物, 从而提高了鉴定速度。例如, 15.98 分钟处谱峰的最佳检索结果是化合物 2-羟基-5-甲基-1,3-苯二甲醛, 其谱图的 99.2% 能够根据准确质量 (图 3) 得到解释。观察到的碎片离子能够以误差不到 1 ppm 的质量准确度匹配到该化合物的结构元素上, 使得鉴定结果的可靠性大大提高。而若是仅使用谱图匹配, 就很难确认鉴定结果。



图 3. 15.98 分钟处的谱峰被鉴定为 2-羟基-5-甲基-1,3-苯二甲醛。已解析数据和谱库匹配结果在 TraceFinder 中的视图截屏。(A) 按得分排序的检索结果列表 (SI 和 HRF 组合)。(B) EI 谱图中的碎片离子列表和根据最佳结果中的元素预测的元素组成结果。

未知物分析

之前的一个研究曾对同一食品包装样品使用单位质量 GC-MS 进行过分析并鉴定出一组值得研究的谱峰，这组谱峰同样出现在了此次分析的高分辨 MS TIC 图中，其洗脱时间依次为：30.6, 42.9, 45.5, 47.8, 49.1 和 53.2 分钟，如图 4 所示。由于它们也是 TIC 中最高的几个峰，

从食品安全角度来说，必须要先鉴定出它们的化学本质，以便确定它们是否会带来健康风险。

更重要的是，这些谱峰无一在 NIST 2014 中找到匹配结果，这使得仅使用单位质量分辨仪器来对这些化合物进行可靠鉴定变得极为棘手。

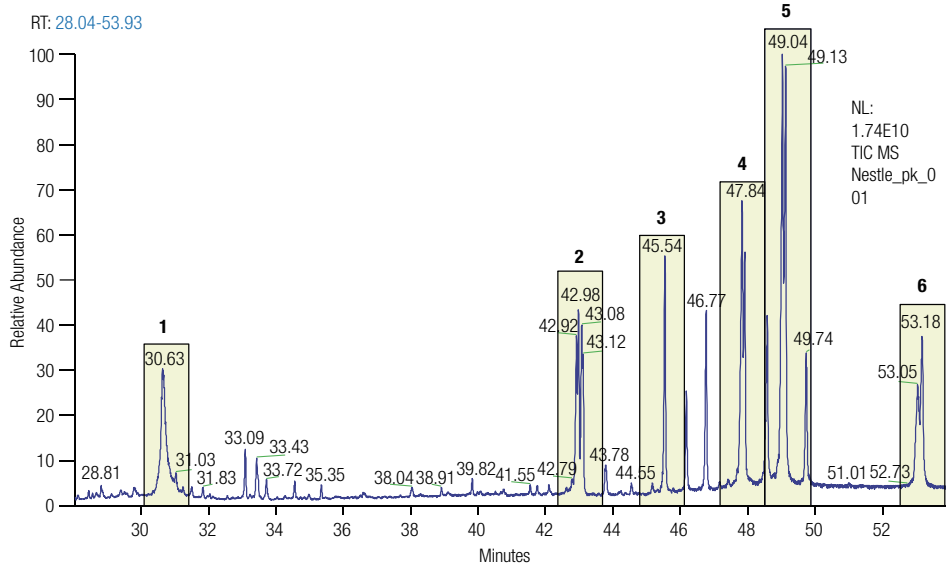


图 4. 包装样品的电子电离 (EI) 总离子流图中六个值得研究的谱峰的放大图。

既然 EI 谱图的谱图库匹配结果不足以得到明确结果，那么就需要借助 PCI 数据来确定分子离子并推断元素组成。由于 PCI 数据是使用甲烷作为反应气来获取的，通常会产生三种加和离子： $[M+H]^+$ 、 $[M+C_2H_5]^+$ 和 $[M+C_3H_5]^+$ 。图 5 所示为出峰时间 45.5 分钟的谱峰 EI 和 PCI 图。PCI 谱图中可见离子 m/z 469.18532 的 $[M+H]^+$ (-0.8 ppm) 峰，和离子 m/z 497.21677 的 $[M+C_2H_5]^+$ (-0.5 ppm) 峰。这些加和物的出现意味着 m/z 468.17783 是分子离子，若没有 PCI 加和离子信息是不可能确定 m/z 468.17783 到底是碎片离子还是分子离子的。而一旦确定了分子离子，就可以推断其元素组成了。元素组成分析是化合物鉴定过程中极为关键的一环，该分析能够根据质量准确度和同位素分布数据来限制可能的分子式数量。本研究使用了元素组成计算器来推测 $[M+H]^+$ 离子的化学式（图 6）。该软件会通过考虑同位素准确质量和丰度信息的同位素分布匹配算法来推测分子式。

该算法先根据单位质量分辨来计算误差容忍范围内所有可能的元素组成，再为每个结果计算理论同位素分布模式，然后在 0~100 区间内给出一个评分，其中 0 分代表完全不符合，100 代表完全匹配。举例来说，当使用 5 ppm 准确质量窗口，允许含有碳（1-30），氢（1-60），氮（1-5），氧（1-10），磷（1）和硫（1）元素时，软件为 $[M+H]^+$ 离子计算出了 12 个可能的分子式。而当准确质量窗口为 1 ppm 时，仅有 3 个可能的分子式，其中仅有一个的理论同位素峰分布与谱图完全匹配： $C_{26}H_{29}O_8$ 。这种程度的质量准确度显著减少了需要被考察的分子式数量，从而提高了分析速度，并且大大增加了分析结果的可靠性。

对精确质量碎片离子进行分析不但能够进一步支持分子式分析结果，还能够生成更详细的结构信息。碎片离子分析既可以使用 EI 谱图中的碎片离子峰，也可以通过额外的 MS/MS 实验进一步确保碎片离子的确来源于分子离子。我们对 $[M+H]^+$ (PCI) m/z 469.18 离子进行了四极杆分离并在 HCD 池中用 15 V 能量进行了碎裂，所得 MS/MS 谱图参见图 7。

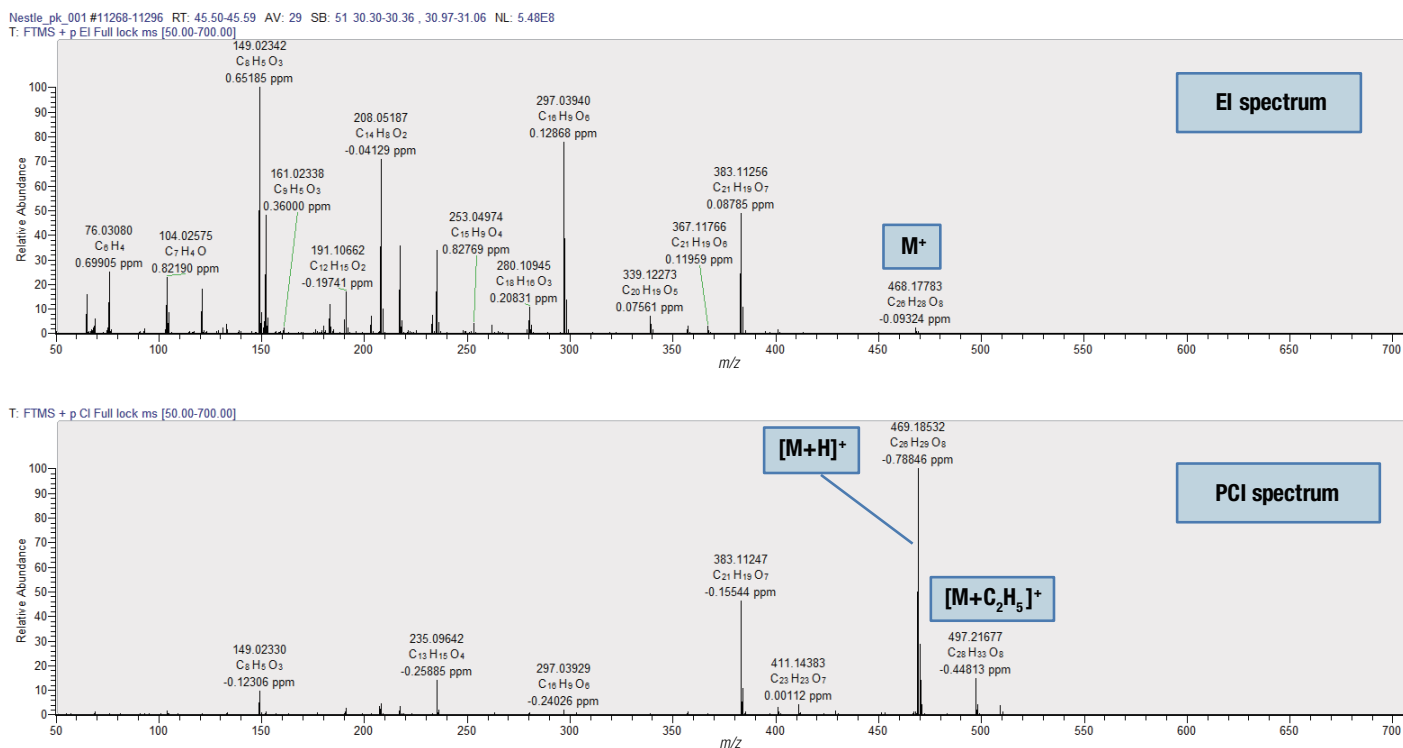


图 5. 包装样品分析中 45.5 分钟处的 EI 和 PCI 谱图对应物质的分子式应为 $C_{26}H_{28}O_8$ 。对谱峰进行了化学式和质量偏差 (ppm) 的注释。PCI 数据以误差不到 1 ppm 的质量准确度为母离子的鉴定提供有力支持。

由图 7 可见，测得的碎片离子中的元素均包含在母离子推测结果中，并且质量准确度皆佳。根据这些信息可以对化合物的结构进行推测，推测结果见图 7 插图。

此外，还可以使用 MassFrontier 软件对推测出的化合物进行理论碎裂，并比对理论碎片谱图与实际谱图之间的差异。因此，即便在这一阶段尚无法十分肯定地鉴定出化合物，

也能得到大量关于未知化合物的结构信息。使用以上流程对六个未知物峰依次进行分析，结果参见表 3。结果的质量准确度 ($< 1 \text{ ppm}$) 使得元素组成推测结果相当可靠，并且得到了 EI 谱图中准确质量碎片数据的进一步支持。值得一提的是，所有的峰都包含一个 m/z 149.02332 离子并且具有一个相同的结构。



图 6. 包装样品中保留时间为 45.5 分钟的峰在元素组成计算器中的 FreeStyle 视图。基于准确质量和同位素分布信息， $[M+H]^+$ 离子的推测化学分子式为 C₂₆H₂₉O₈。三个可能的化合物质量差异都在 1 ppm 以内，其中最佳结果的同位素分布与理论分布的匹配度达到 100%。

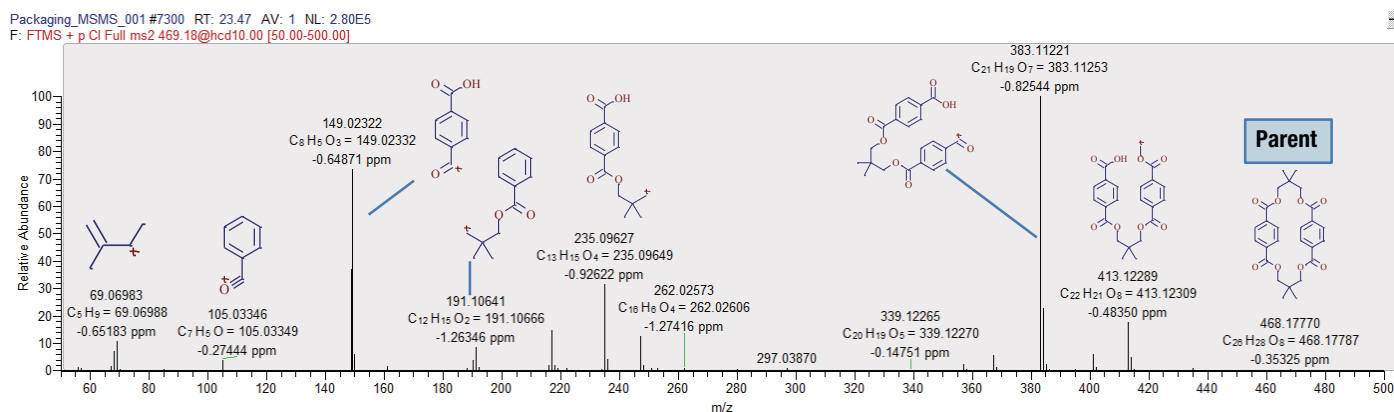


图 7. PCI 离子 m/z 469.18 的 MS/MS 谱图。母离子由四极杆选择，并在 HCD 池中碎裂。使用 MassFrontier 解释 3 ppm 质量准确度窗口内的碎片离子。

表 3. 谱峰及初步的化合物元素组成鉴定结果汇总。所有准分子离子（quasi-molecular ions）的绝佳质量准确度（< 1 ppm）使得推测结果更为可靠。

谱峰序号	保留时间 (min)	分子式	[M+H] ⁺ <i>m/z</i>	[M+H] ⁺ 质量误差 (ppm)	[M+C ₂ H ₅] ⁺ 质量误差 (ppm)	[M+C ₃ H ₅] ⁺ 质量误差 (ppm)
1	30.6	C ₁₄ H ₁₈ O ₆	283.11762	0.0	0.5	0.1
2	42.98	C ₂₂ H ₂₀ O ₈	413.12303	-0.2	-0.3	0.0
3	45.5	C ₂₆ H ₂₈ O ₈	469.18532	0.7	-0.4	0.0
4	47.5	C ₂₄ H ₂₄ O ₈	441.15424	-0.4	-0.4	-0.3
5	49.1	C ₂₇ H ₃₀ O ₈	483.20112	-0.5	-0.1	0.3
6	52.0	C ₂₈ H ₃₂ O ₈	497.21684	-0.3	0.1	0.3

解锁结构信息

对全扫 EI 和 PCI 数据的进一步分析显示，当提取 C₂₆H₂₈O₈ 母离子数据时，色谱图中出现了三个峰（图 8）。准确质量 MS/MS 实验提供的宝贵的结构信息对于确定该化合物是什么、是否会造成安全风险至关重要。三个异构体的 MS/MS 谱图（图 9）既有相似性，又有不同点。

异构体 2 和 3 都有一个 *m/z* 401.12309 (C₂₁H₂₁O₈) 的基峰和一个 *m/z* 132.02058 (C₈H₄O₂) 离子。

而异构体 1 的基峰则是 *m/z* 383.11253 (C₂₁H₁₉O₇)，并且没有 *m/z* 132.02058 峰。能够得到这些离子的可靠元素组成推测结果非常有帮助，这些结果能够帮助分析人员纵观全局。*m/z* 401.12309 对应母离子失去一个 C₅H₇ 基团，而 *m/z* 383.11253 则是母离子失去 C₅H₁₀O。MassFrontier 可以用来解释推测的化学结构中如何产生这些离子。通过这些信息，精确质量 MS/MS 结果使得获得详细的化合物结构信息成为可能。

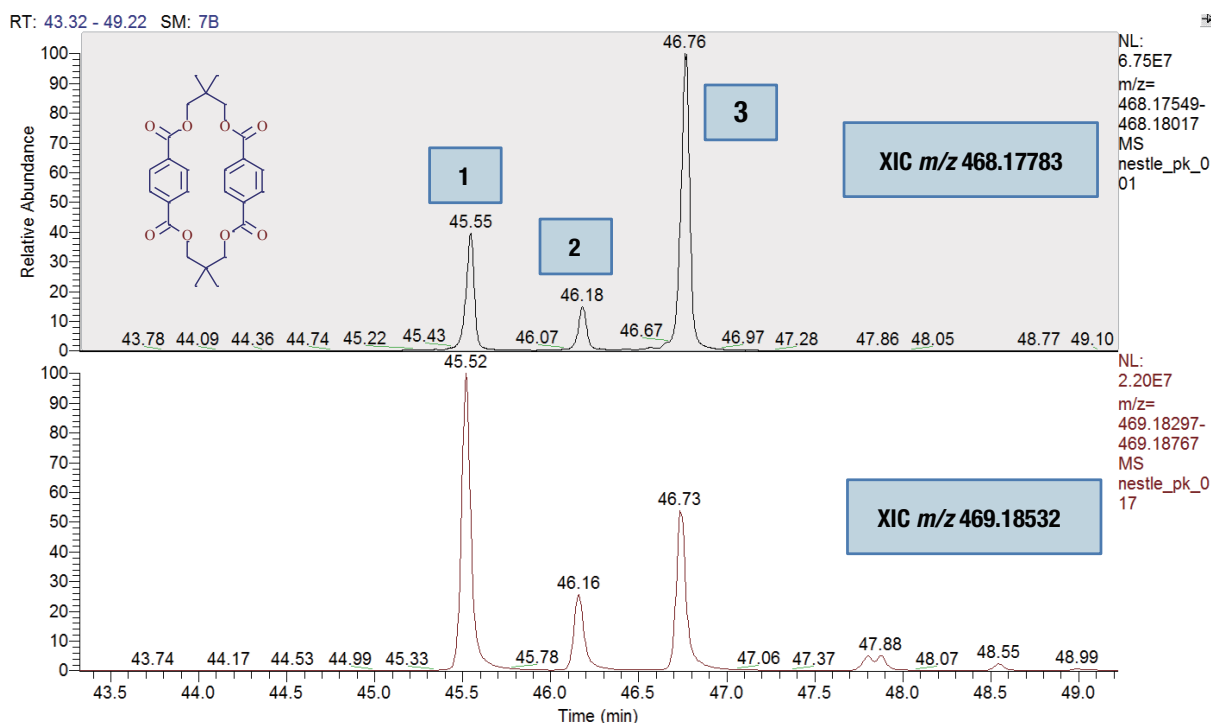


图 8. 包装样品 EI 全扫描数据中的 *m/z* 468.17783 离子和 PCI 全扫数据中的 *m/z* 469.18532 离子 XIC 图中可见同一母离子质量有 3 个异构体。插图为推测的化合物结构。

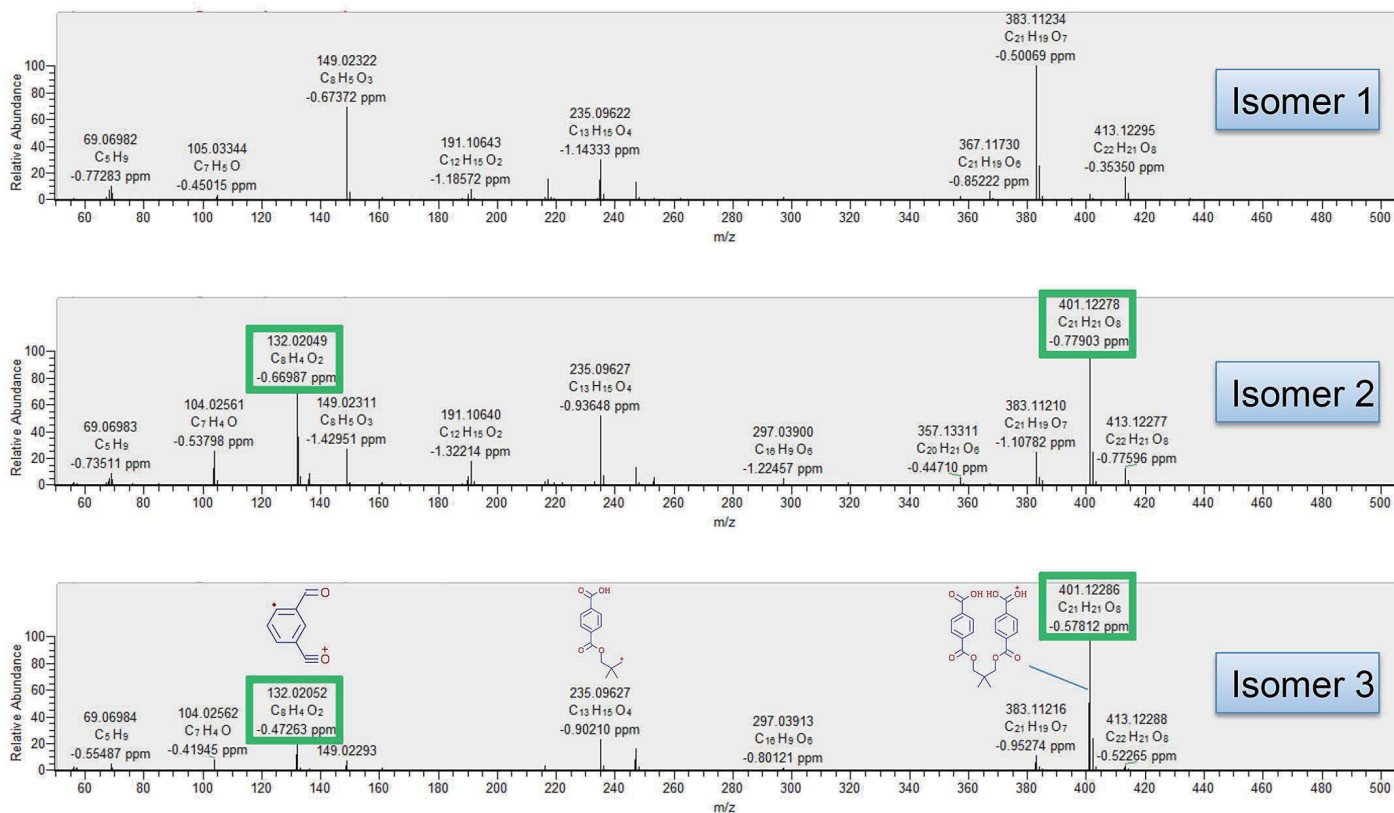


图 9. m/z 469.18 离子的三个异构体的 MS/MS 谱图可见异构体 2 和 3 的裂分模式不同。尤其是基峰为 401.12286 以及有 m/z 132.02049 离子出现。

结论

本研究的结果证明 Thermo Scientific Q Exactive GC 混合四极杆-Orbitrap 质谱仪，辅以简便易用的软件工具，是进行复杂样品分析和未知化合物鉴定的得力工具。Orbitrap 质谱仪能够实现绝佳的分辨率和质量准确度，因而可以实现不受限于浓度的、快速、可靠的样品表征。本研究通过使用谱图匹配对食品包装样品进行了快速的已知化合物筛

查并使用准确质量进行了合理性分析。对于未在谱库中检索出结果的化合物，利用 EI 和 PCI 信息进行了可靠的分子离子和碎片离子化学式推测。此外，能够进行高分辨、准确质量 MS/MS 实验的能力使得未知物鉴定工作流程更为完整，也使得分析结果的可靠性更上一级台阶，更提供了重要的结构信息。



Orbitrap 组学俱乐部



赛默飞小分子质谱应用技术群