

X500R QTOF系统SWATH[®]技术在保健品非法添加领域中的应用

SWATH[®] research of High Resolution Mass Spectrometry SCIEX X500R QTOF system on illegal confirmation of Health Products

于洁, 程海燕, 李立军, 靳文海

SCIEX, 亚太应用支持中心(上海), 中国

引言

近年来, 随着保健品市场的扩大, 为了使保健品的效果更加快速明显, 不法商贩通过在保健品中添加药物来达到立竿见影的效果。长期食用具有非法添加药物的保健品会对身体产生副作用。随着质谱技术的发展, 国家相关监管部门每年都会采用质谱技术抽查监管保健品的非法添加。

SCIEX X500R QTOF高分辨质谱系统特有的SWATH[®] (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra) 技术将母离子的质量范围分成多个质量可变窗口, 每个窗口内的所有离子一起碰撞碎裂, 从而确保得到最全面的离子的碎片信息。SWATH[®]技术所测得的二级碎片保证了所有离子碎片的连续性, 其独有的可变窗口, 能够根据离子的多少智能分配质量窗口的大小, 从而保证采集到最高质量的二级谱图。此外, SCIEX软件专利技术的去卷积功能, 使得即使在复杂基质样本中仍可对二级碎片离子进行很好的归属。SWATH[®]技术使得二级碎片灵敏度更高、数据追溯性更强, 其二级碎片的连续性, 使得一针进样分析即可同时定性和定量, 因此不仅在保健品非法添加筛查和确证领域具有显著优势, 更可同时提供高准确度、高灵敏度和高线性范围的定量结果。

SCIEX X500R QTOF高分辨质谱系统SWATH[®]技术能够在高扫描速度下同时保持高分辨率、高准确度、高灵敏度和高线性范围, 结合全新的SCIEX OS软件, 实现了仪器控制、数据采集、数据处理集于一体的流程分析。本实验应用SWATH[®]技术, 建立了国家食品药品监督管理局(2017年版)规定的68种保健品非法添加药物的定性和定量方法。

样品前处理:

减肥茶: 茶包浸泡后直接上样。

胶囊类和片剂型药物: 取胶囊内容物(片剂型药物研细, 取粉末) 10 mg, 甲醇10 mL超声溶解, 离心, 取上清液直接进样。

色谱方法:

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18, 50 × 2.1 mm, 2.6 μm;

流动相: A: 5mM乙酸铵水溶液

B: 乙腈

梯度洗脱如下:

流速: 0.25 mL/min; 柱温: 40°C;

进样量: 10 μL

Time (min)	A%	B%
0	90	10
10.0	10	90
12.0	10	90
12.1	90	10
15.0	90	10

质谱方法:

扫描方式: SWATH[®]采集方式

离子源: ESI源

CDS自动校正

IS电压: 5500V 气帘气CUR: 30psi

雾化气GS1: 55 psi 辅助气GS2: 55 psi

源温度TEM: 550°C 碰撞气CAD: 8

碰撞能量CE ± CES: 35 ± 15V

数据采集和SWATH[®]设置流程

SWATH[®]技术是将所有离子分配到连续的窗口内, 结合X500R超快的扫描速度, 可记录所有离子的二级碎片谱, 再通过软件强大的去卷积功能将碎片归属到对应母离子, 该种扫描方式可确保低含量的目标物的二级信息不被遗漏, 得到更准确的非法添加药物的筛查结果。

1、导入筛查药物列表。

Select or verify the analyte and internal standard names and masses.

Row	IS	Group	Name	Chemical Formula	Adduct/Ch.	Precursor Mass (Da)	Fragment Mass ID
1			Oxazepam	C15H13ClN2O2	[M+H] ⁺	295.0782	
2			Oxazepam	C15H13ClN2O2	[M+H] ⁺	287.0558	
3			Lorazepam	C15H10Cl2N2O2	[M+H] ⁺	321.8121	
4			Etazolam	C16H11ClN4	[M+H] ⁺	295.0745	
5			Alprazolam	C17H13ClN4	[M+H] ⁺	309.09015	
6			Triazolam	C17H12ClN4	[M+H] ⁺	343.0518	
7			Clonazepam	C15H10ClN2O3	[M+H] ⁺	316.04835	
8			Atenolol	C14H22N2O3	[M+H] ⁺	267.17032	
9			Venlafaxine	C17H17NO2	[M+H] ⁺	278.12146	
10			Nefedipine	C17H18N2O6	[M+H] ⁺	347.12376	
11			Nimetodipine	C18H19N2O6	[M+H] ⁺	361.13941	
12			Nimetodipine	C18H19N2O7	[M+H] ⁺	419.10128	
13			Fenflutamine	C17H17F3N	[M+H] ⁺	232.13076	
14			Glipizide	C21H27N5O4S	[M+H] ⁺	446.18565	
15			Repaglinide	C27H39N2O4	[M+H] ⁺	453.27478	
16			Glibornuride	C18H19N2O4S	[M+H] ⁺	367.1686	
17			Phenformin hyd...	C18H15N5	[M+H] ⁺	286.14082	

2、设置色谱积分参数。

For each component, configure the parameters to optimize peak integration

Algorithm: MQ4

Apply peak parameters to all of the components

- Minimum Peak Width: 3 points
- Minimum Peak Height: 100.00
- S/N Integration Threshold: 3
- XOC width: 0.02 Da
- Gaussian Smooth Width: 0.0 points
- Noise Percentage: 40.0 %
- Baseline Subtract Window: 2.00 min
- Peak Splitting: 2 points

Units & Calibration Defaults

- Apply units to all of the analytes
- Concentration units: Area
- Regression parameter: Linear
- Regression type: Linear
- Weighting type: 1/x

Chromatogram: Oxazepam (285.0881 - 285.0888) from... RT: 5.96 min

3、设置库搜索条件，本次实验同时建立了此68种药物的高分辨二级碎片数据库，每个药物具有低、中、高和复合能量四张谱图，方便基质样品的筛查和确证。

Configure the library search parameters

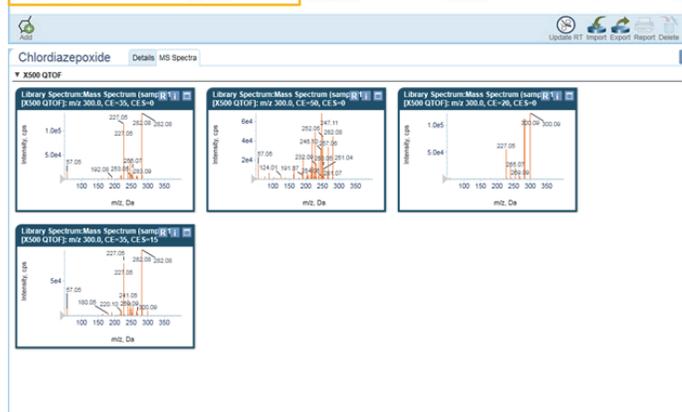
Perform Library Search

- Library Search Algorithm: Candidate Search
- Results Sorted By: Purity
- Library Spectra Type: All Spectra
- Libraries To Search: Health Products_AM, Drug Screen 1.0, Non-targeted Peaks

Algorithm Parameters

- Precursor Mass Tolerance: +/- 0.4 Da
- Collision Energy: +/- 5 eV
- Retention Time: +/- 0.1 min
- Fragment Mass Tolerance: +/- 0.4 Da
- Ignore Isotopes In Unknown:
- Use Polarity:
- Use Collision Energy Spread:
- Use Compound Specific Purity Threshold:
- Maximal Number Of Hits: 5
- Intensity Threshold: 0.05
- Minimal Purity: 10.0 %
- Intensity Factor: 5

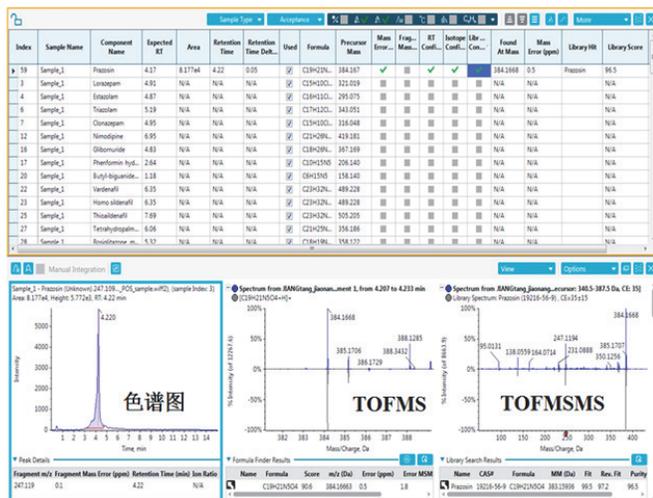
Name	CAS	Formula	Molecular Weight
Acetaminofen	031217-01-7	C25H29NO3	466.57681
Alprazolam	28981-97-7	C17H13ClN4	308.76552
Amino tadalafil	385769-84-6	C21H18N4O4	390.36202
Amiodipine	88150-42-9	C20H25NO5Cl	408.87062
Amobarbital	57-43-2	C11H15N2O3	220.27264
Aprovel	2932-68-7	C14H20N2O3	260.33661
Barbitol	57-44-3	C8H12N2O3	184.19279
Butyl-biquamide hydrochloride	1190-63-0	C8H15N5	187.21704
Captopril	62571-96-2	C9H15NO3S	217.28545
Chlorazepoxide	58-25-3	C16H14ClN3O	299.79540
Chromazone	60-77-3	C11H12ClNO3S	273.73602
Chlorpheniramine	113-50-8	C16H16ClNO2	274.78900
Clonazepam	1822-61-3	C15H10ClN2O3	315.71170
Clonidine	4205-90-7	C9H9ClN2	230.09407
Diazepam	439-14-5	C16H13ClN2O	284.74075
Ephedrine	299-42-3	C10H15NO	165.23257
Etazolam	29975-10-4	C16H11ClN4	294.73086
Fatidipine	98189-69-7	C18H19ClNO4	384.29433
Fenfluramine	456-24-2	C12H16F3N	231.25700
Furosemide	54-31-9	C12H16ClNO5S	330.74435
Glibenclamide	10238-21-8	C23H28ClNO5S	484.00412



4、导入所有标准品和样品的SWATH® 数据进行筛查

Index	Retention Time	Retention Time Dev.	Used	Calculated Concentration	Accuracy	Formula	Precursor Mass	Mass Error	RT Conf.	Isotope Conf.	Library Conf.	Found At Mass	Mass Error (ppm)	Library Hit	Library Score	Ion Ratio
581	5.95	0.01	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C15H13Cl...	295.079		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	295.0764	-0.8	No Match	0.0	29.5
582	4.89	0.14	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C15H13Cl...	287.059		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	287.0554	-9.8	No Match	N/A	33.8
583	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	C15H13Cl...	321.019		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	No Match	N/A	N/A
584	4.66	0.21	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C16H13Cl...	295.075		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	295.0851	-31.9	No Match	N/A	65.6
585	4.91	0.20	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C17H13Cl...	309.090		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	309.0828	-26.3	No Match	N/A	33.9
586	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	C17H13Cl...	343.051		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	No Match	N/A	N/A
587	4.71	0.24	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C15H13Cl...	276.040		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	276.2408	63.4	No Match	N/A	36.9
588	7.23	0.04	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C14H22N2O...	267.170		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	267.1779	28.5	No Match	0.0	43.6
589	4.57	0.01	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C17H17NO2	278.121		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	278.2179	23.2	No Match	N/A	39.6
590	5.69	0.04	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C17H18N2O6	347.124		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	347.1222	-4.4	No Match	N/A	23.8
591	6.26	0.36	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C18H19N2O6	361.139		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	361.1477	23.0	No Match	N/A	97.7
592	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	C23H28ClNO...	418.181		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	No Match	N/A	N/A
593	4.89	0.05	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C12H16F3N	232.131		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	232.1329	9.4	No Match	N/A	99.1
594	3.44	0.23	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C23H27NO...	446.186		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	446.1788	-35.3	No Match	N/A	74.2
595	5.88	0.09	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C17H17NO2	453.225		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	453.2768	2.7	No Match	N/A	72.7
596	5.33	0.30	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C18H19N2O...	367.169		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	367.2695	272.0	No Match	N/A	36.9
597	N/A	N/A	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	C18H15N5	286.140		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	N/A	N/A	No Match	N/A	N/A
598	5.51	0.03	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C18H20N2O...	357.127		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	357.1228	-8.2	No Match	N/A	175.9
599	7.23	0.03	<input checked="" type="checkbox"/>	<2 points	N/A	C16H14ClN3O	266.167		<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	266.1757	32.5	No Match	0.0	15.0

5、通过Mass error、RT、Isotope、Library匹配确证，筛选出全部绿灯的结果。



SWATH®数据采集在复杂基质中，二级碎片归属性更好，而且灵敏度也更高，能够更加准确的匹配和确证。本实验在4份保健品中分别筛查确证出硝西泮、西地那非和哌唑嗪药物，且一级质量精度均在1ppm以内，二级数据库匹配95%以上，X500R高分辨质谱优异的稳定性结合SWATH®采集方法优异的二级碎片，使化合物确证更加准确和具有专属性。

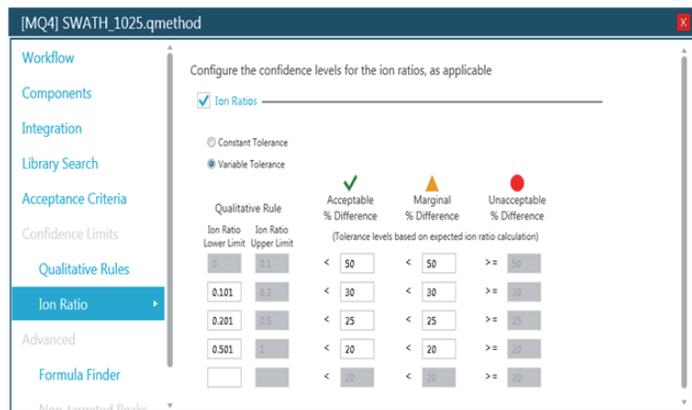
Index	Sample Name	Component Name	Expected RT	Area	Retention Time	Retention Time Det.	Used	Formula	Precursor Mass	Mass Error	Frag. Mass	RT Conf.	Isotope Conf.	Library Conf.	Found At Mass	Mass Error (ppm)	Library Hit	Library Score	
59	Sample_1	Prazosin	4.17	7.572e4	4.22	0.05	☑	C19H22N4	384.167	0.5	384.1668	0.5	☑	☑	☑	384.1668	0.5	Prazosin	95.1
118	Sample_2	Prazosin	4.17	N/A	N/A	N/A	☑	C19H22N4	384.167	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
177	Sample_3	Prazosin	4.17	N/A	N/A	N/A	☑	C19H22N4	384.167	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
236	Test_sample	Prazosin	4.17	N/A	N/A	N/A	☑	C19H22N4	384.167	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

二、SWATH®二级定量

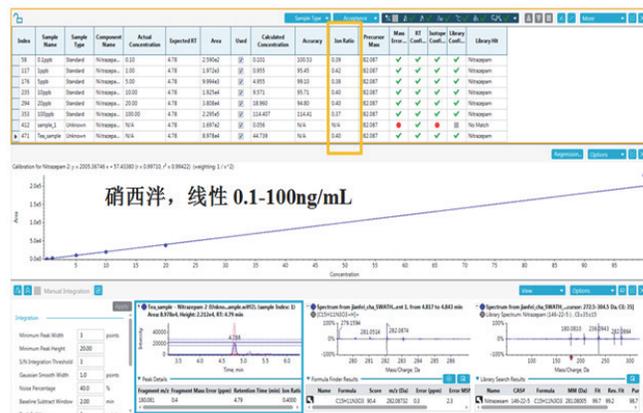
SWATH®采集获得连续的二级碎片谱，可一针进样同时应用二级碎片进行定量分析，该扫描模式提供更高的二级灵敏度和更宽的定量线性范围，同时SCIEX OS软件还可进行离子丰度比的自动计算，提供更高专属性的定量结果。以硝西泮为例，硝西泮定量线性范围可从0.1ng/mL-100 ng/mL，线性方程回归系数 $r=0.99710$ ，各

浓度点准确度在94.8%-114.41%之间。硝西泮标准曲线各浓度点离子比率范围在0.37-0.42之间，确证样品中硝西泮40.9ng/mL，离子比率为0.40，与标准品浓度点离子比率相比，添加样品离子比率在允许误差范围内，更加保障确证结果。

1、在SCIEX OS软件中，勾选离子比率可变误差设置，SCIEX OS软件自动设置好离子比率的误差置信范围。



2、SCIEX OS软件一目了然呈现定量准确度、线性范围、离子比率、色谱图、一级准确质量数、同位素比和二级谱库确证结果。



对4份保健品中筛查出的非法添加药物进行定量，定量结果如下表所示：

	减肥茶	胶囊1	胶囊2	胶囊3
硝西泮	40.9			
西地那非				23.9
哌唑嗪		15.7		

总结

本实验应用X500R QTOF高分辨质谱系统以及专利的SWATH®技术，建立了基于2017版国家食品安全监督抽检实施细则规定的68种保健品非法添加药物的筛查和定量方法。SWATH®技术是一种非依赖性数据采集，通过智能化可变窗口和专利去卷积技术，保证在基质复杂的情况下，也能一针进样同时获得高质量的一级和二级之谱图。结合高分辨二级数据库使保健品非法添加确证更简单和准确。

SWATH®数据可获得更高灵敏度的二级谱图，其不仅可用于非法添加药物的筛查和确证，还可同时应用二级数据进行定量分析，当基质样品有干扰时，SWATH®二级定量能够有效的降低背景噪音，排除干扰离子。优异的二级碎片还可自动计算离子丰度比，使定量的结果更加准确可靠。

SCIEX OS软件系统将采集和数据处理方法参数内置，更加简单易用。集成式的软件平台设计，简单明了的模块化设置可同时完成方法建立、数据采集以及定性和定量的数据处理。强大的SWATH®数据采集方式结合方便使用的SCIEX OS软件平台使保健品非法添加确证更加方便和准确，可大大提高工作效率。

参考文献

欧盟SANTE/11945/2015法规.

SCIEX, European Union Reference Laboratory (EURL-FV) Almeria, Spain and the EMEA team, Analysis of Regulated Pesticides in Baby Food Using SCIEX X500R QTOF.

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。

© 2017 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-7118-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