

采用高分辨精确质谱 (LC/Q-TOF MS) 和精确质量工具对洋葱中的吡虫啉代谢物进行鉴定

应用简报

食品

作者

E. Michael Thurman 和 Imma Ferrer

环境质谱分析中心

环境工程系

科罗拉多大学

波尔得, 科罗拉多州

美国

Jerry A. Zweigenbaum

安捷伦科技有限公司

2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808

美国

摘要

采用 Agilent 6540 Q-TOF 液质联用系统和 Agilent MassHunter 软件工具对吡虫啉的 6 种新代谢物进行 MS/MS 分析鉴定。这些代谢物及其结构可以通过精确质量 MS/MS 研究进行推断, 使我们更好地理解吡虫啉在洋葱中的代谢机理, 和用于毒性研究的新目标代谢物。



Agilent Technologies

前言

本文介绍了该工作的一份更完整的技术报告中所使用的工具 [1]。吡虫啉是上世纪九十年代末投入市场的一种新烟碱类农药，用于控制同翅目害虫，如蚜虫、飞虱和粉虱，以及一些甲壳虫。它已成为应用最广泛的杀虫剂之一，尤其是在农业领域。吡虫啉是烟碱型乙酰胆碱受体激动剂，对昆虫具有极高的特异性 [2,3]。

对于蜜蜂来说，吡虫啉是毒性最高的杀虫剂之一。研究显示，吡虫啉和其他一些农药在农业上的广泛应用，可能是欧洲和北美自 2006 年以来蜂群不断减少的原因之一。因此，在探讨植物中农药降解和代谢的研究中吡虫啉是一个重要杀虫剂 [4]。

虽然吡虫啉在多种农作物中的代谢已有研究，但在洋葱中的代谢尚未有详尽研究。本文介绍了联用超高效液相色谱 (UHPLC)/四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF MS) 在 MS、全离子 MS/MS 和目标 MS/MS 模式下对洋葱中的吡虫啉代谢物进行定量分析的方法学和工具。采用一些精确质量工具来鉴定代谢物，包括以前没有报道过的 6 种代谢物。采用该方法确定了吡虫啉代谢物在洋葱、土壤和浸出液间的分布。

实验部分

试剂与标样

以甲醇为溶剂制备单独的农药储备液（浓度约为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），并于 -18°C 下贮存。取适量该储备液，按照前述方法 [1]，用乙腈和水稀释制备工作标准液。同样按照前述方法 [1]，在 45°C 下采用 1.0 mol/L HCl 溶液水解吡虫啉 1 小时制得胍代谢物。

仪器

本研究采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统，联用配备电喷雾喷射流技术的 Agilent 6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量 Q-TOF 液质联用系统。分析条件见表 1。

表 1. LC 和 Q-TOF MS 运行条件

液相色谱运行条件

色谱柱	分析柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8 反相柱, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm (部件号 963967-906)
柱温	25 $^\circ\text{C}$
进样量	20 μL
流动相	A = 0.1% (体积比) 甲酸水溶液 B = 乙腈
线性梯度	10% B 保持 5 min, 然后在恒流下, 25 min 内由 10% B 升到 100% B, 保持 100% B 10 min
流速	0.6 mL/min

Q-TOF MS 分析条件

离子模式	ESI, 正离子模式
雾化器压力	45 psig
干燥气流速	10 L/min
干燥气温度	250 $^\circ\text{C}$
鞘气流速	11 L/min
鞘气温度	350 $^\circ\text{C}$
喷嘴电压	正离子模式时 0 V
碎裂电压	190 V
毛细管电压	3500 V
质量范围	50–1000 m/z
检测器采集速率	2 GHz
分离能力	35000 \pm 500
准确度	2 ppm

农药应用

洋葱 (*Allium cepa L.*) 在文献 [1] 所述的温室环境下生长，采用认证种子。每株洋葱施加 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的吡虫啉水溶液 200 mL。

样品前处理

水样（浸出液）每周采集一次，连续采集三周。土壤和洋葱样品在生长 28、38 和 53 天时分别平行采集 3 份，各总共 36 份。必要时过滤水样，并加入氘代吡虫啉。土壤和洋葱的提取过程见图 1。

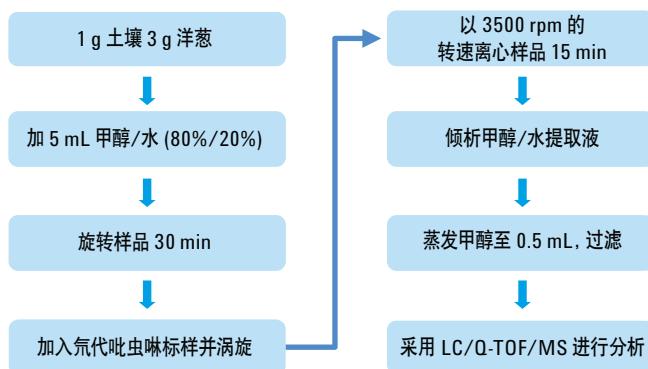


图 1. 土壤和洋葱样品的提取流程图

数据分析

使用了包括分子特征提取器、分子式生成器、质量分析器和精确质量数据库等数种安捷伦软件工具来辅助鉴定吡虫啉代谢物。同时还使用了包括氯过滤器在内作者编制的改编版软件 [5]，因为母体化合物已进行氯化反应 [6]。

结果与讨论

已知代谢物的数据库检索

洋葱提取物典型的总离子流色谱图 (TIC) 非常复杂，因此很难以鉴定任何一种吡虫啉代谢物（图 2A）。当然，通过对吡虫啉及其 12 个已知代谢物进行数据库检索，揭示了至少存在可能与母体化合物（测定值 m/z 256.0594），以及酰代谢物（测定值 m/z 211.0743）有关的两个峰，见洋葱提取物的提取离子色谱图 (EIC)（图 2B）。MS/MS 分析鉴定出 m/z 256 峰为吡虫啉 [1]。 m/z 211.0743 峰值作为酰代谢物其计算精确质量在 1 ppm 以内，该峰的 MS/MS 分析也支持其鉴定结果 [1]。与这些化合物标样的比较可确证它们的同一性。

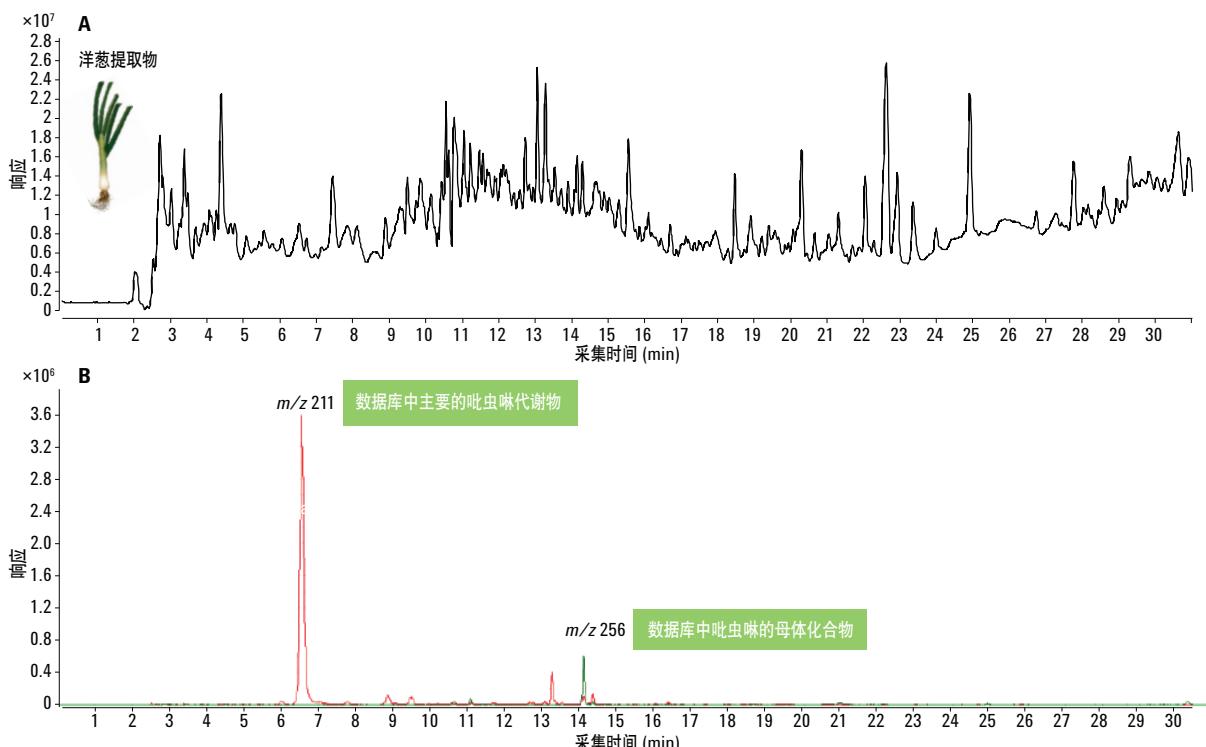


图 2. 经第 28 天收获施加了吡虫啉的洋葱样品，其提取物的典型 TIC 图 (A)，以及吡虫啉一些已知代谢物的提取离子色谱图 (EIC)，图中可见母体化合物和 m/z 211 酰代谢物两个主峰 (B)

精确质量数据库查到了 12 种已知代谢物中的两种，即 4-羟基吡虫啉和吡虫啉的尿素类似物。根据 5 ppm 精确质量窗口内的精确质量和提取离子色谱图，发现其他 9 种已知代谢物在洋葱提取物中均不存在 [1]。

诊断离子和全离子 MS/MS 分析

诊断碎片离子涉及吡虫啉的部分结构，它们与化合物的相关结构一致，一般存在于其代谢物中。采用全离子 MS/MS 方法，可以通过碎裂生成这些碎片离子，使我们可以对整张色谱图进行诊断离子检索 (DIS)。要做到这一点，只需从低到高改变碎裂电压 (适用于 TOF 或 Q-TOF)，或将碰撞能量从 0 改变到中等强度 (仅适用于 Rf 模式下的四极杆 Q-TOF) 来生成目标诊断离子，然后用来鉴定潜在的新代谢物。

通过 MS/MS 生成了吡虫啉代谢物的 m/z 126 离子，它是吡虫啉母体化合物结构的一部分 (图 3)。采用 m/z 126 离子对施加了吡虫啉的洋葱提取物进行 DIS，鉴定了一些可能是代谢物的峰 (图 3)。其中一个是胍类似物 (保留时间为 6.6 min)，它是一个已知代谢物。通过随后的 MS/MS 分析， m/z 209.0589 (保留时间为 6.4 min 的肩峰) 鉴定为胍类似物的烯烃，它是一个新代谢物 [1]。通过 MS/MS 检出第三个峰，即 m/z 226.0845 (保留时间为 6.0 min)，为吡虫啉的去氨基类似物。该代谢物以前也没有报道过 [1]。通过 DIS 发现，未施加吡虫啉的洋葱样品中均没有 m/z 126 峰。

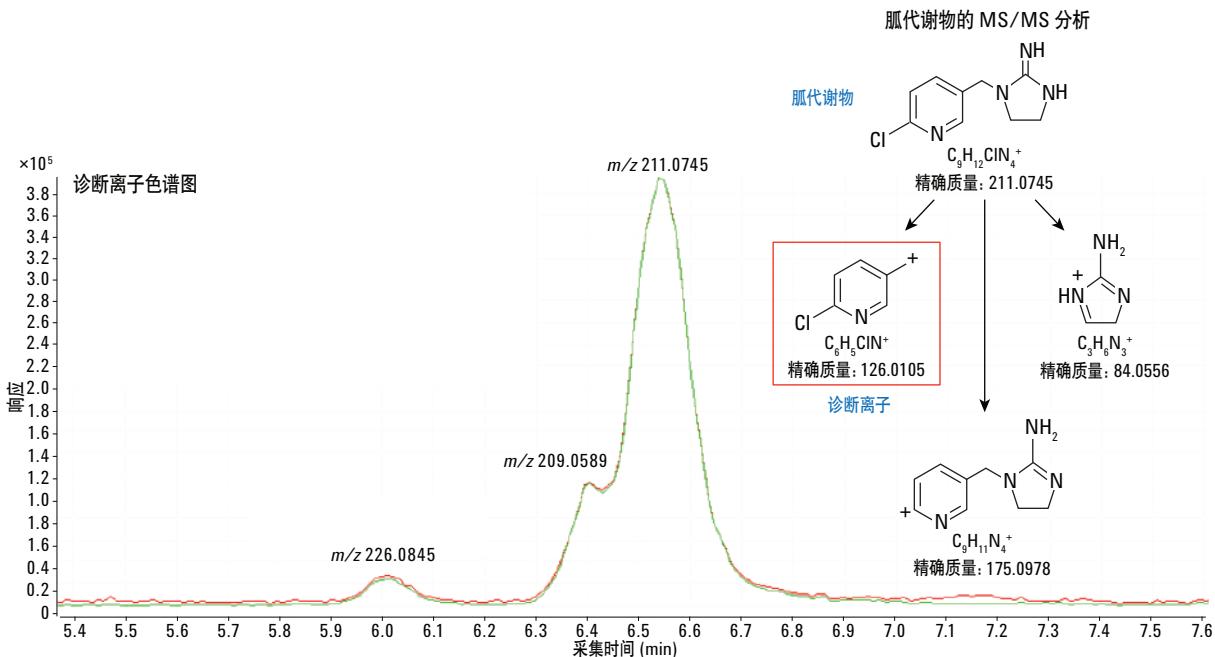


图 3. 施加吡虫啉的洋葱样品提取物全离子 MS/MS 分析的诊断离子，取 m/z 126 离子，它是胍代谢物 MS/MS 分析的产物离子，也是吡虫啉结构的一部分。施加农药 28 天后采集洋葱样品。碰撞能量设定为 0 和 30 eV

采用氯过滤器筛选代谢物

MassHunter 软件中的氯过滤器 [6] 是另一种用来鉴定新代谢物的工具。首先，采用分子特征提取器在色谱图中寻找离子强度超过 10000 计数值的化合物。因为吡虫啉仅含一个氯原子，那么，针对提取出的化合物只能产生包含一个氯原子的分子式。当对洋葱提取物运行氯过滤器时，发现了一些可假定的新代谢物，但无论采用数据库检索还是诊断离子检索均未找到它们（图 4）。

仅由氯过滤器发现的一个化合物 (m/z 354.0955, 保留时间 10.96 min)，比吡虫啉大 98 个质量单位。从分子式上看，该化合物比母体化合物多 5 个碳原子和 2 个氧原子，而氯和氮原子的数量与母体化合物相同，这表明它与另一个基团已发生结合。

据报道，谷胱甘肽（包含半胱氨酸、甘氨酸和谷氨酸的三肽）可与一些农药结合，但是尚没有与吡虫啉结合的报道。然而谷胱甘肽对于新代谢物来讲增加的质量数过多，谷氨酸本身就包含 5 个碳原子。可是，谷氨酸会增加 147 个质量单位，而非 98 个。

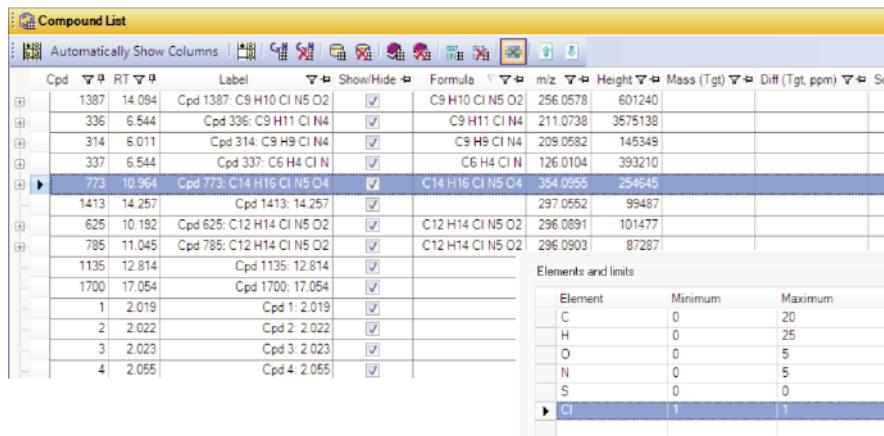


图 4. 氯过滤器生成仅包含一个氯原子的分子式。一些代谢物由该工具确定，包括一个精确质量在 m/z 354.0955 的新代谢物（突出显示）

通过对该化合物进行 MS/MS 分析，发现了两个 46 amu 基团的中性丢失（图 5）。这些丢失的每一个的测定质量数只能是 COOH_2 (甲酸)。谷氨酸硝基基团的还原反应符合该数据。另一个主要的碎片是 m/z 209.0550 (测定的精确质量) 离子，它也可以通过谷氨酸丢失形成（图 5）。利用该数据鉴定出上述新代谢物的结构为吡虫啉的谷氨酸缀合物。

另一种由氯过滤器发现的化合物 (m/z 240.0996, 分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{ClN}_5$)，与增加了甲基的 m/z 226 (吡虫啉氨基类似物) 代谢物一致，由 MS/MS 分析鉴定它为甲基吡虫啉 [1]。在洋葱植物中，通常会发现 DNA 甲基化，而不是农药。基于上述理由，该推断的结构可能代表了吡虫啉的另一个新毒性代谢物。

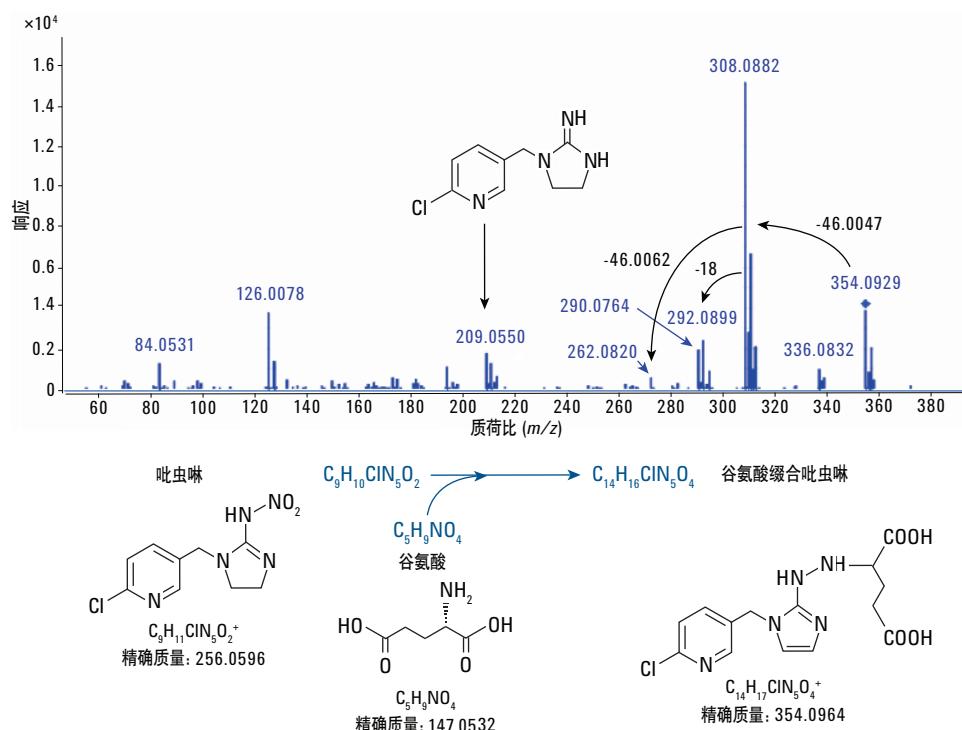


图 5. 使用 MS/MS 离子对并结合植物代谢的相关知识来确定 m/z 354.0955 代谢物的结构。两个 46 amu 基团的中性丢失只能解释为两个 COOH_2 (甲酸) 碎片的丢失。谷氨酸还原吡虫啉上硝基的反应，解释了代谢物上两个羧基基团和吡虫啉上 5 个碳原子和 6 个氢原子的来源，从而得到了代谢物正确的质量数

采用质量分析器区分差异

采用安捷伦质量分析器软件，将由分子特征提取器发现的施用农药洋葱中的所有化合物，与未施加农药的洋葱质控样品中的化合物进行比较（图 6）。然而两种洋葱提取物的分析曲线太复杂，不能抽取出推断的代谢物，该结果表明对洋葱施加农药后除了农药本身的代谢外，还会导致洋葱化学组成的极大变化。这个现象非常明显，它敦促我们应针对农药对洋葱营养成分的影响开展进一步的研究，无论是正面的还是负面的。

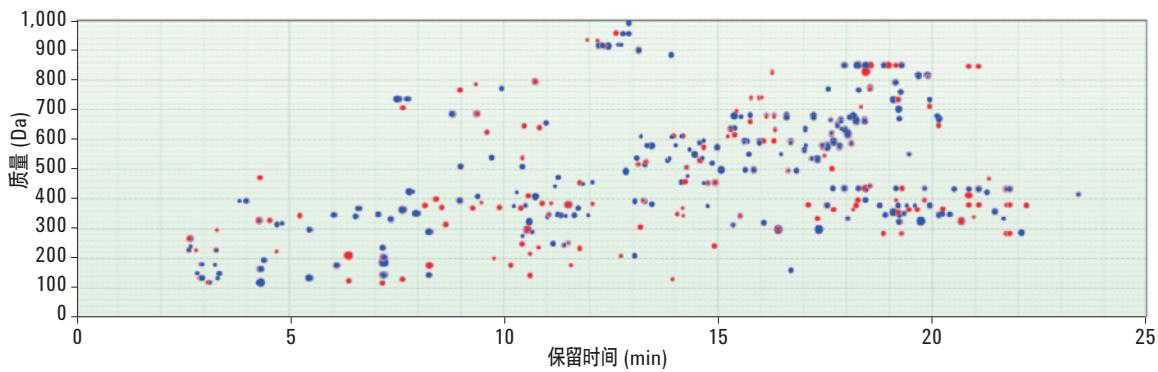
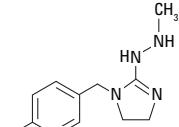
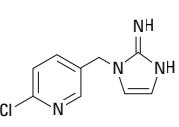
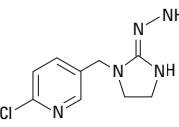
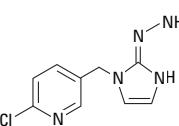
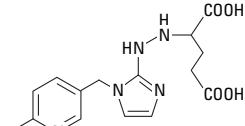
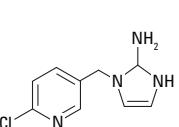


图 6. 将三份空白、未施加农药的洋葱样品提取物的质量数和保留时间平均值，与三份施加了吡虫啉并于第 28 天收获的洋葱样品的平均值进行比较（蓝点为两组样品的公共特征，红点为施加农药样品的独特特征）

吡虫啉及其代谢物的分布

本研究鉴定出 6 种吡虫啉的新代谢物（表 2）。针对洋葱和土壤提取物中吡虫啉及其 6 种代谢物的分析，表明洋葱中主要含胍代谢物，土壤中主要是未代谢的农药。相对于胍代谢物和母体农药，其他 5 种新代谢物均以痕量存在（图 7）。

表 2. 通过 MS/MS 分析新鉴定出的 6 种吡虫啉代谢物

代谢物	元素组成	保留时间 (min)	精确质量 [M+H] ⁺	化学结构
甲基化的吡虫啉	C ₁₀ H ₁₄ ClN ₅	8.3	240.1010	
胍类似物的烯烃	C ₉ H ₉ ClN ₄	6.4	209.0589	
吡虫啉-氨基类似物	C ₉ H ₁₂ ClN ₅	6.0	226.0854	
烯烃-吡虫啉-氨基类似物	C ₉ H ₁₀ ClN ₅	4.8	224.0697	
谷氨酸缀合吡虫啉烯烃胍	C ₁₄ H ₁₆ ClN ₅ O ₄	10.7	354.0964	
胍吡虫啉的同分异构体	C ₉ H ₁₁ ClN ₄	7.1	211.0745	

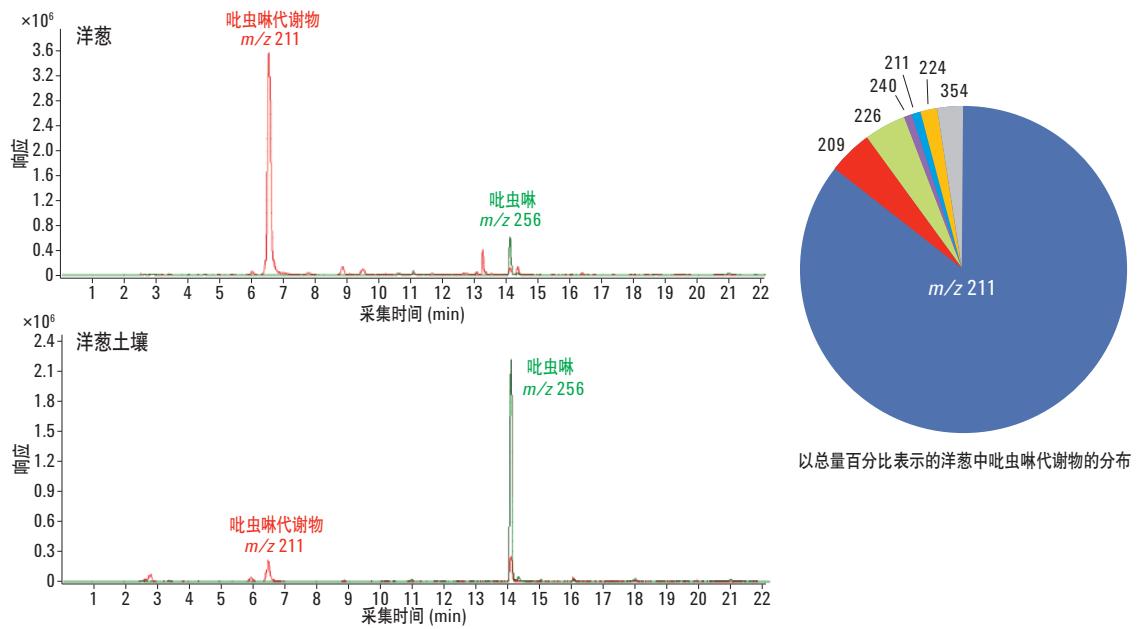


图 7. 土壤和洋葱提取物中的农药及其主要代谢物胍类似物 (m/z 211) 的分布。该饼形图展示了洋葱中 5 种新鉴定的代谢物和胍类似物 (m/z 211) 的分布, 以 7 种代谢物总量的百分比表示, 包括两种胍类似物的同分异构体

结论

除了可以开展洋葱和环境中农药降解的详细研究, Agilent 6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量 Q-TOF 液质联用系统和软件还为吡虫啉代谢物的鉴定和表征提供了功能强大的工具。使用诸如精确质量数据库检索、诊断离子和全离子 MS/MS、氯过滤器和质量分析器等工具, 几乎不需要预先了解结构即可解析出这些新代谢物。如果需要对复杂样品中响应强度为中等的、众多先前未知的母体化合物衍生物进行鉴定, 这些工具均能适用。

参考文献

1. E.M. Thurman, *et al.* "Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa L.*) using high-resolution mass spectrometry and accurate mass tools" *Rapid Commun Mass Spectrom.* **27**(17):1891-903 (2013)
2. S. Kagabu "Discovery of imidacloprid and further developments from strategic molecular designs" *J. Agric. Food Chem.* **59**, 2887- 2896 (2011)
3. M. Tomizawa, J.E. Casida "Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors" *Annu. Rev. Entomol.* **48**, 339-364 (2003)
4. T. Iwasa, *et al.* "Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*" *Crop Protection* **23**, 371-378 (2004)
5. E.M. Thurman and I. Ferrer "The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formula by accurate mass" *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2807-2816 (2010)
6. I. Ferrer and E.M. Thurman "Identification of a new anti-depressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *Anal. Chem.* **82**, 8161-8168 (2010)

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2013
2013年11月22日, 中国印刷
5991-3397CHCN



Agilent Technologies