

DOI: 10.19650/j.cnki.cjsi.J2107720

非定向筛查数据非依赖采集策略研究进展*

杜安¹, 樊子便¹, 石琳¹, 许秀丽², 贾玮¹

(1. 陕西科技大学食品与生物工程学院 西安 710021; 2. 中国检验检疫科学研究院 北京 100123)

摘要:数据采集方式是质谱分析的关键步骤,是影响实验效率以及结果准确度的重要因素。较之于传统的数据采集方式,近年来出现的数据非依赖采集技术具有高通量、高覆盖度、高准确性等优势,从而成为蛋白质组学与代谢产物定量和组学研究的强有力工具,对食品分析领域有重要的参考和借鉴价值。综述了目前主要的几种数据非依赖采集原理和数据处理最新进展并突出了在食品分析中的非定向筛查潜力,总结了非定向筛查数据非依赖采集在食品安全性分析、食品真实性分析、食品中功能性成分分析的应用。最后探讨数据非依赖采集在食品分析中面临的挑战和未来发展趋势。

关键词:数据非依赖采集;食品分析;非定向筛查;高分辨质谱;精准定量

中图分类号: TH843 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 550.1030

Advance in non-targeted screening for data independent acquisition

Du An¹, Fan Zibian¹, Shi Lin¹, Xu Xiuli², Jia Wei¹

(1. School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

Abstract: Data acquisition is an essential procedure affecting the efficiency and accuracy of the experiment in mass spectrometry analysis. Compared with the traditional data acquisition methods, the data independent acquisition technology emerging in recent years has the advantages of high throughput, high coverage and high accuracy, which has become a powerful tool for proteomics, metabolite quantitative and omics research, and has important reference value in the field of food analysis. The principles of the current main data independent acquisition and recent advance in data processing were reviewed as well as the potential of non-targeted screening in food analysis was highlighted. Furthermore, the application of non-targeted screening data independent acquisition in analysis of food safety, food authenticity and functional active ingredients was summarized. Finally, the challenges and future trends of data independent acquisition in food analysis was discussed.

Keywords: data independent acquisition; food analysis; non-targeted screening; high resolution mass spectrometry; accurate quantitation

0 引言

数据采集方式作为质谱(mass spectrometry, MS)及串联质谱分析的关键步骤,是影响实验效率以及结果准确度的重要因素^[1]。近年来,随着四极杆-静电场轨道离子阱(quadrupole-orbitrap, Q-Orbitrap)质谱与四极杆-飞行时间(quadrupole-time of flight, Q-TOF)质谱等高分辨率质谱采集速度不断提升,逐步发展出区别于多反应监测的

数据非依赖采集技术(data independent acquisition, DIA),其整合了数据依赖采集(data dependent acquisition, DDA)技术和定向采集技术的优势,从而成为蛋白质与代谢产物定量和组学研究的强有力工具^[2-3]。本文综述了不同DIA采集原理及数据处理最新研究进展和分析策略,突出了其在食品分析中的非定向筛查潜力,总结了DIA在食品安全性分析、食品真实性分析和食品中功能性成分分析中的应用,最后探讨了DIA在食品分析中面临的挑战和未来发展趋势。

收稿日期:2021-04-06 Received Date: 2021-04-06

* 基金项目:国家自然科学基金(31801643)、国家十三五重点研发计划子课题(2019YFC1606306-2)项目资助

1 DIA 原理及分类

在色谱运行过程中, DIA 指在一定隔离窗口范围内系统地取样分子离子以采集二级 MS/MS 数据, 不依赖于一级 MS 全扫描 (full scan, FS) 信息。在一次进样分析中, 根据分子离子隔离窗口范围大小, DIA 可分为离子全碎裂采集 (all ion fragmentation, AIF or MS^E)、所有理论质谱序贯窗口采集 (sequential window acquisition of all theoretical mass spectra, SWATH)、可变数据非依赖采集 (variable data independent acquisition, vDIA) 和多路复用数据非依赖采集 (multiplex data independent acquisition, mDIA) 等^[4]。

1.1 MS^E 与 AIF

MS^E 与 AIF 原理类似, 指 FS 后对扫描到的所有分子离子进行全部碎裂以进行二级 MS/MS 扫描。与其他 DIA 相比, 全碎裂扫描模式获得的碎片信息最为丰富, 可结合二级碎片的同位素与同量异位结构的信息用于筛查中的确证, 如在药物代谢产物鉴定时, 需要通过断裂碎片信息对多条代谢途径研究与区分同量异位分子离子, 从而确定代谢物的元素组成与分子式, 确定生物转化的反应类型。然而全碎裂采集到的二级 MS/MS 谱图受基质干扰效应较为严重, 导致待测目标物质灵敏度或者谱库匹配分数降低, 不利于准确鉴定和精准定量^[5]。

1.2 SWATH

所有理论质谱序贯窗口采集 (SWATH) 指 FS 后, 将质荷比 (mass to ratio, m/z) 400-1200 扫描范围平均分为 32 个连续的 25 m/z 的隔离窗口, 依次进行碎裂并进行二级 MS/MS 扫描, 如图 1(a) 所示^[6]。分子离子隔离窗口被等分, 显著降低了单位时间内二级扫描 MS/MS 谱图的复杂性, 从而提升了层级谱图间的可溯源性。其次 SWATH 采集获得的全扫描与二级碎裂片段信息均可形成色谱轮廓图用于定性与定量, 且信息列表不需要根据待分析物进行调整, 即质谱条件一致, 样品经一次进样测定后可运用分析软件针对不同待分析物多次分析, 数据易溯源, 有更好的数据完整性与通量。vDIA 和 mDIA 的提出是在 SWATH 基础之上为适应仪器扫描速度和高斯色谱轮廓峰构建而改进相应参数提出来的, 其中 vDIA 可根据分析物主要分布的 m/z 范围从而灵活地选择不同大小分子离子隔离窗口^[7-8], 例如, 使用分子离子隔离窗口大小为 m/z 30 (m/z 100~130, 125~155, 150~180, 175~205...) 接续更大的分子离子隔离窗口 m/z 100 (m/z 505~605, 600~705, 700~805, 800~905) 来进行二级 MS/MS 扫描, 其中, m/z 5 的重叠窗口用以防止处于隔离窗口两端的分子离子的二级 MS/MS 信息遗失, 如图

1(b) 所示。mDIA 最早应用于蛋白质组学: 首先在四极杆随机选择 5 个 m/z 4 窗口, 经碰撞池裂解后储存于离子阱 C-Trap 中, 离子数量至 10×10^6 时通过压强差送往 Orbitrap 扫描, 即获得质量窗口步长为 20 m/z 的二级谱图, 并以此方式直至覆盖整个全扫描范围。获得的数据利用去多重累积技术将每个碎片按质荷比大小顺序排列, 从而最大程度地减少共流出物和杂质的干扰, 提高数据非依赖采集的选择性和灵敏度^[9]。针对食品农药兽药检测, mDIA 技术指不同窗口范围内的分子离子依次被四极杆选择并储存在 C-Trap 中, 在 Orbitrap 完成上次扫描后, C-trap 中储存的混合离子 (同一 MSX ID) 注入到 Orbitrap 中进行二级 MS/MS 扫描 (图 1(c) 所示)。

DIA 主要挑战在于二级 MS/MS 扫描缺乏与分子离子的对应性, 因此在给定的色谱宽度下, 优化的主要工作在于保证足够数据采集点数 (一般大于 10 个) 的前提下缩短分子离子隔离窗口宽度从而提高二级 MS/MS 扫描的选择性^[10]。然而, 分子离子隔离窗口宽度缩小将导致二级 MS/MS 扫描窗口数增多, 使得一次完整的扫描时间 (全扫描时间+所有二级 DIA 扫描时间, cycle time) 延长, 不利于色谱峰的重建。此外, 为保证离子检测质量准确性, 需要足够高分辨率 (通常一级 Full MS 分辨率大于 60 000, 二级 MS/MS 扫描分辨率大于 15 000), 但分辨率得提高会导致仪器扫描速度降低, 从而使得 cycle time 延长^[11]。相比固定分子离子隔离窗口大小的 SWATH, vDIA 灵活选择感兴趣的分子离子质量范围和 mDIA 将不感兴趣的质量范围的分子离子分段整合进行二级 MS/MS 扫描使得仪器满足筛查条件的需求。

1.3 其他 DIA

鉴于 DDA 产生的二级 MS/MS 谱图有较高选择性 (分子离子隔离窗口在 m/z 3~5 左右), 因此将 DDA 与 DIA 两者结合起来也是目前的热点之一 (Data dependent-independent acquisition, DDIA), 其能解决 m/z 值不能区分的共洗脱分子离子问题^[12] 并且 DDIA 可以鉴定蛋白质数量是 SWATH 的两倍^[13]。有报道将 DDIA 用于分析牛奶中 180 种兽药, 西红柿中 220 种农药和玉米中 50 种真菌毒素, 较之于传统的 DDA 和 DIA, DDIA 对于目标分析物具有更高的鉴定重复率和更少的假阳性或假阴性结果, 对于代谢物和降解产物等非目标物质可更好进行数据回溯^[14]。而对于多次进样的数据非依赖采集技术, 如 PAcIFIC^[15], 在 SWATH 技术基础上获得更窄的分子离子隔离窗口从而提高二级 MS/MS 谱图的选择性和灵敏度, 其选择性甚至可与 DDA 相当, 但多次进样延长了分析时间。基于纳流液相串联四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱三合一质谱平台, 利用数据非依赖采集可将分子离子隔离窗口缩小至 m/z 3 左右, 结果表明这种方法的定量限低至 14~435 amol, 具有良好的线性和重现性, 但仪

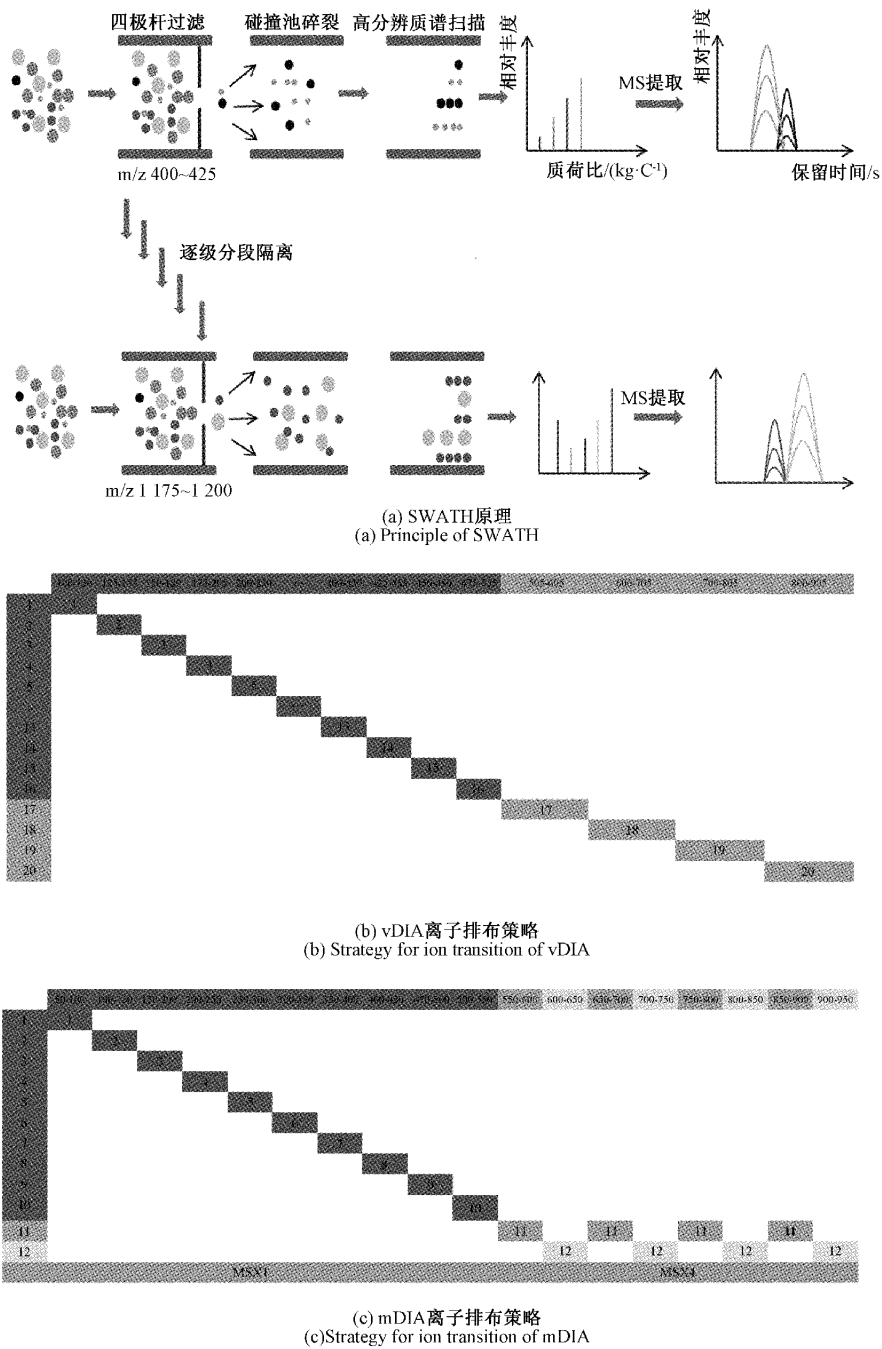


图1 DIA原理及相应离子排布策略

Fig. 1 Principle of DIA and corresponding strategy for ion transition

器价格昂贵且分析时间较长^[16]。

2 数据处理

由于二级 MS/MS 谱图包含多个分子离子碎裂产生的子离子,构建分子离子与碎片离子之间的对应关系是目前 DIA 数据处理的核心部分。对于蛋白质、多肽等

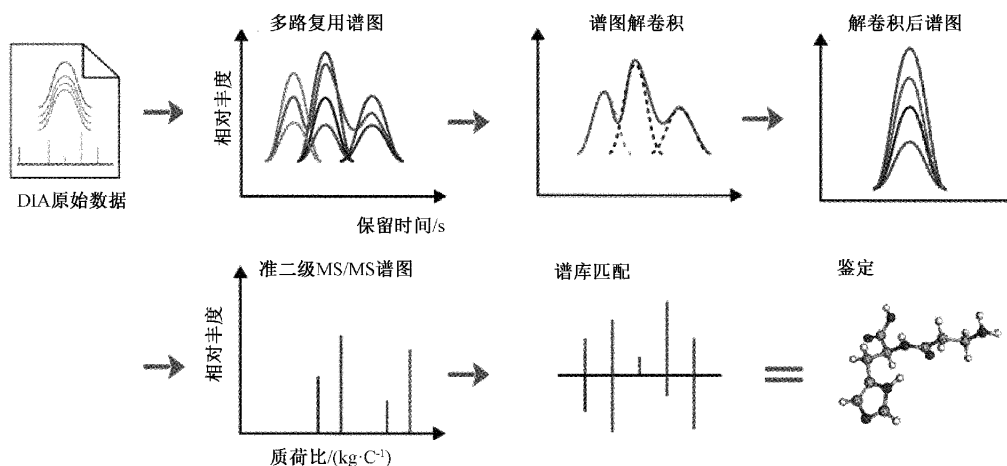
大分子,Zhang 等^[17]已全面总结数据处理软件的一般工作流程和最新研究进展。数据处理软件可以分为谱库依赖型(library-based)和谱库非依赖型(library-free)两种,目前应用最广泛的 library-based 软件一般工作流程为:将 DDA 采集或分组 DDA 采集到的同一类型样品信息与蛋白序列数据库在线匹配从而获得肽段分子离子和碎片离子的 m/z 、归一化 RT、碎片离子相对丰度以及离子迁移

率、漂移率时间等谱库参数,用于从 DIA 数据中提取目标肽段信息。随着近年来计算机深度学习的发展,预测碎片离子谱图与实验谱图非常相似,如 DeepMas^[18] 和 pDeep^[19],但其学习到的谱图仍来源于仪器 DDA 所产生的数据,并且在未来的发展中还需要进一步研究其在 DIA 分析中的可行性。

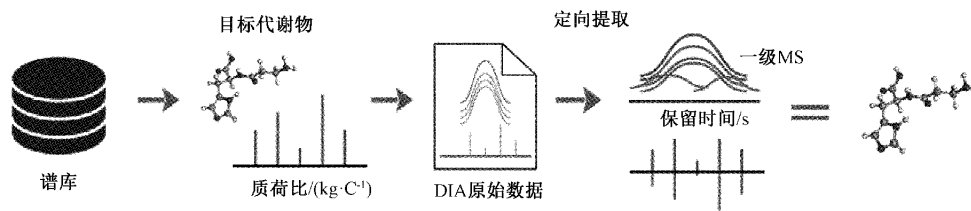
library-based 软件最大挑战是在 DIA 原始数据中无法分析除 library 以外的肽段,这大大限制了 DIA 分析范围的覆盖性。目前以 library-free 的软件替代方案有了长足的发展,其可以分以谱为中心 (spectrum-centric) 和以肽为中心 (peptide-centric) 两类数据处理工具,如 DIA-Umpire^[20] 和 PECAN^[21]。Spectrum-centric 工具数据处理流程为:从 DIA 数据中检测共变化的分子离子-碎片离子组或解卷积混合二级 MS/MS 谱来产生准谱,其质量依赖于质谱分析中分子离子信号的大小和可解释性,这些准谱将与传统的数据库进行比对搜索。Spectrum-centric 面临的主要挑战在于具有低响应分子离子信号的准谱所鉴定的结果假阳性率比较高,另外对于复杂样本一级 MS

信号很有可能被共流出的非常接近或相同 m/z 所干扰。而以 peptide-centric 的 PECAN 软件可通过一个肽段序列谱库直接从 DIA 数据中检测肽段,不需要肽段保留时间信息,在此基础上,PIQED^[22]、MSPLIT-DIA^[23] 和 PEAKS^[24] 进一步扩展了 DIA 数据分析范围。library-free 方法对于新肽段鉴定具有较大潜力,但目前缺乏简洁方便的算法去保证 library-free 软件鉴定结果的可靠性。

对于复杂代谢产物、天然活性物质、脂肪酸等小分子,常用的开源软件包括 XCMS^[25]、OpenMS^[26] 和 MS-DIAL^[27] 等,支持用户开发新的算法和更简便工作流程去处理不同采集模式下获得的数据。MS-DIAL 利用解卷积的方式提高分子离子与碎片离子的高斯轮廓相似分布关系再进行结构鉴定,但此方法的特异性不够高从而导致假阳性或假阴性率较高。目前最新发展以代谢物为中心的定向提取 MetDIA 和 MetaboDIA 软件,可进一步提高复合二级 MS/MS 谱图对应关系,但其鉴定到代谢物的数量仍然依赖于现有数据库的大小和 DDA 采集的局限性,如图 2 所示^[28]。



(a) 非定向小分子代谢物数据处理流程
(a) Untargeted workflow for data processing of metabolites of small molecule



(b) 定向小分子代谢物数据处理流程
(b) Targeted workflow for data processing of metabolites of small molecule

图 2 小分子代谢物数据处理流程^[28]

Fig. 2 Flow for data processing of metabolites of small molecule^[28]

在食品分析领域中,Wong 等^[29] 综述了基于超高效液相色谱-高分辨质谱 (ultra-high performance liquid

chromatography-high resolution mass spectrometry, UHPLC-HRMS) 平台筛查食品中农药多残留的数据采集方法、谱

库构建和数据处理软件工具。其中,谱库包含保留时间、分子离子和碎片离子 m/z 、响应强度等信息,结合 TraceFinder 软件可实现复杂食品基质中农药多残留的筛查分析,而对于未包含在谱库中的待分析物,本课题组通过目标分析物质谱裂解途径解析与特征碎裂片段筛选,从而最大化感兴趣物质信息覆盖^[30]。但目前仍缺乏自动化数据处理软件去非定向提取复杂食品基质中外源性风险物质和功能活性物质等小分子分析,绝大多数依赖于 DDA 建立的标准物质谱库从而定向提取 DIA 数据中目标物质信息。因此,如何对二级 MS/MS 谱图中分子离子与相应碎片离子的溯源关系深度学习和构建信息更为丰富的谱库是数据处理工作的主要方向^[31]。

3 非定向筛查流程构建

食品因具有成百上千种化合物类别、目标分析物宽浓度动态范围而成为复杂基质,目前对于食品分析大多数集中于靶向和已知化合物的测定,具有灵敏度高和特异性强等优势,但对于一些新出现的和未知的感兴趣物质,如从塑料中迁移到食品中的塑化剂、掺杂掺假物质、大分子蛋白质活性降解产物、代谢物等不能筛查到。非定向分析则为这些物质的筛查和鉴定提供可能,其分析流程一般包括样品预处理、仪器分析和数据处理等步骤,其优化主要原则为在保证可接受的假阴性率前提下减少假阳性结果发生^[32]。

样品前处理对于下游数据采集和数据分析结果有重要影响。对于非定向筛查分析,主要关注非特异性化合物,理想的前处理方法为在最小化基质效应的同时实现对感兴趣物质尽可能多的萃取。目前,用于在食品中非定向筛查的样品前处理方法主要包括“稀释-注射”法、液液萃取法、固相萃取法和 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) 法等。其中“稀释-注射法”通过直接稀释样品来减少基质效应,具有操作简便和不遗漏分析物的优势,但其主要缺点在于降低分析物的灵敏度且可能对仪器造成污染^[33]。因此,“稀释-注射法”常用于低复杂食品基质和高丰度分析物,例如蜂蜜和葡萄酒的研究。液液萃取、固相萃取都广泛应用于食品样品中非定向筛查,固相萃取相比于液液萃取具有更高的方法重现性、低有机溶剂消耗、容易自动化和高通量等优势,但其需要选择合适的吸附剂材料和进行洗脱控制,相比于液液萃取较为费时。通过结合液液萃取和固相萃取的优势,QuEChERS 成为复杂食品基质中农药兽药残留筛查最为普遍的方法,常以乙腈作为萃取溶剂,NaCl 和 Na_2SO_4 用作分相盐,PSA、 C_{18} 和 GCB 等用作固相萃取或分散固相萃取吸附剂。为防止对 pH 敏感的分析物损失,使用柠檬酸盐缓冲液和醋酸盐缓冲液维持 pH 的稳

定^[34]。不同的样品前处理都将不同程度影响仪器性能特征,需要综合考虑分析物的性质、样品基质复杂程度和研究目的来选择合适的样品前处理方式。

非定向筛查主要依托的平台为具有高分辨和高通量能力的质谱技术^[35]。其中,数据采集方式是仪器分析的最为关键参数。与定向多反应监测和具有 inclusion list 的 DDA 相比,DIA 无需提前指定目标离子,可实现对可疑物质和非预期物质信息采集;与无 inclusion list 的 DDA 相比,DIA 可以无歧视获得所有质量范围内离子的信息,不会造成低丰度分子离子二级 MS/MS 碎片信息损失,另外由于 DIA 的 cycle time 一致从而使得离子色谱轮廓峰较为对称,其定量结果较为准确。结合 DIA 高通量筛查、数据可回溯等优势,其已成为非定向筛查分析中重要步骤。数据处理是非定向筛查最为费时的步骤,也是高通量非定向筛查的主要瓶颈。目前非定向筛查数据处理策略主要包括两种,分别是可疑筛查和未知筛查。对于可疑筛查,通过直接从文献或者权威机构报告中获得一份可疑筛查目录,利用可疑分析物的分子式或者结构等信息用于精准离子搜索,接下来通过离子强度、信噪比、峰面积、峰形和同位素等自动过滤标准以减少假阳性结果和缩短数据分析时间,最后通过标准物质或者与二级 MS/MS 谱库匹配以确证分析物质。未知筛查用于初步鉴定样品中没有任何先验信息的未知化合物,其常利用统计学方法在空白对照组和样品处理组之间选取差异的变化离子用于下一步的匹配分析确证工作,如变量分析、主成分分析和偏最小二乘分析等。或者,利用特异性结构碎片、中性损失、同位素和质量差异等信息用于标记质谱中基于相同分组化合物候选峰。在二级 MS/MS 谱图中,随着碰撞碎裂能量的增加,潜在的候选离子峰强度下降趋势也可作为标记潜在分子离子的附加标准。当候选离子确定,通过一套如元素数量限制、同位素比、价启发式等标准,利用其精准质量生成相应分子式,通常用在线二级 MS/MS 谱库进行确证^[36]。

4 非定向筛查 DIA 在食品分析中的应用

4.1 食品安全性分析

食品安全隐患来源于生产、加工和流通过程中引入、产生的外源性风险物质,包括农药残留、兽药残留、塑化剂、真菌毒素、食品添加剂与非法添加物五大类^[37]。在食品样品外源性风险物质定量分析中,靶向液相色谱-质谱是一个有力且可靠的分析工具,然而其只能用于测定预先定义好的风险物质,对于许多存在于食品基质中未预期的或者生物转化且对消费者有害的物质不能进行安全监控。基于高分辨质谱的 DIA 可实现食品中外源性风险物质非定向筛查。Ramos 等^[38]利用 SWATH 技术鉴定

果汁和果泥塑料包装材料中23种未知迁移物质。在非定向筛查婴幼儿配方食品和鸡蛋中农药残留时,为了优化SWATH方法选择性、灵敏度和定量准确性,Vazquez等^[39]分别用1、5、10、20的不同隔离窗口数进行数据采集,对应600、120、60、30 m/z的分子离子隔离窗口范围和0.31、0.52、0.78、1.32 s的扫描周期。以婴幼儿配方食品中苯磺酰氧磷的鉴别为例,当分子离子隔离窗口数为1时,其实质为AIF,获得的二级MS/MS谱图包含了许多共洗脱干扰碎片离子从而无法进行准确鉴定;随着分子离子碎裂窗口数增加,二级MS/MS谱图的选择性和灵敏度显著提升,但同时扫描周期的延长不利于色谱峰的重建进而不易于进行准确定量,通过优化,最终选定分子离子隔离窗口数为10的SWATH方法,统计分析上述优化后的SWATH方法采集到的农药残留数据相对标准偏差后发现其重复性与定向多反应监测数据相当。

由于感兴趣的兽药残留分子离子质荷比范围分布在m/z 100~505之间,本课题组设置分子离子质量隔离窗口为m/z 30,对于m/z 500~900则设置质量隔离窗口为m/z 100,cycle time为1.8 s的vDIA方法,满足重建提取离子色谱峰的要求,对罗非鱼中兽药和代谢产物进行非定向筛查^[40]。Goon等^[41]在香菜、孜然、辣椒和小豆蔻等香料中筛查农药多残留非定向筛查时,通过特异性化合物的分子离子和碎片离子精准m/z可实现可回溯性搜索。此外,Wang等^[42]结合保留时间(± 0.5 min)、分子离子和碎片离子质量准确度($\pm 5 \times 10^{-6}$)等参数,发现vDIA和mDIA可在添加不同水平浓度农药的10种蔬菜和水果中具有类似的离子获取效率,同一浓度分别鉴定729和764种农药。本课题组在干发酵羊肉香肠中测定生物胺时比较了相同分子离子隔离窗口下vDIA和mDIA离子获取效率,虽然mDIA由于MSX值得增加导致灵敏度降低,但与vDIA相比,mDIA的loop count减少了1/3,因此在同一扫描周期前提下,mDIA可在感兴趣的m/z 150~200范围内获得更丰富碎片离子信息,更有利于样品中感兴趣物质信息的深度挖掘^[43]。

4.2 食品真实性分析

食品真实性分析包括食品产地、品种、年份、有用成分等鉴别或溯源^[44]。DIA由于具有非特异性和高通量筛查等特点而广泛应用于食品真实性分析中。Yilmaz等^[45]利用MS^E技术在酸奶、奶酪和冰淇淋中获得标志物凝胶肽段的分子离子和碎片离子信息,从而实现一些乳制品的鉴别。然而,MS^E技术受基质效应较为严重,严重依赖样品前处理和色谱分离技术以获得较为干净的二级MS/MS谱图。因此,Hu等^[46]利用SWATH技术采集3种具有相关性的商品虾胰蛋白酶消解后的肽段信息,使用多反应定向监测筛查通过正交偏最小二乘判别分析获得的标志物肽段,最后鉴定到的27个生物标志物肽段,不依赖高分辨质谱和统计学方法即可实现不同虾的准确鉴别。针对不同乳制品鉴别(牛奶、羊奶和水牛奶),本课题组利用vDIA结合食品组学策略,获得 β -胡萝卜素、麦角钙化醇、壬酸、癸酸和辛酸5种小分子标志物,定量结果表明 β -胡萝卜素只存在于牛奶中,麦角钙化醇只在水牛奶中发现,而山羊乳中壬酸、癸酸和辛酸的含量均高于对照组(牛奶和水牛奶)^[47]。

4.3 食品功能活性成分分析

随着人们对食品营养和健康关注度的不断提升,发现和监测不同食品中具有抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等生物活性功能物质成为目前研究热点。DIA由于具有对所有分子离子碎片信息全覆盖和可回溯性分析等优势,从而对于不同食品基质中具有潜在生物活性成分的筛查具有较大潜力。Ma等^[48]通过SWATH技术筛查到红酒中具有抗氧化活性的165种多酚化合物,其对感官品质和质量控制具有重要参考价值。本课题组利用DDA建立葛根保健品中的标准谱库,并对其功效成分如异黄酮与黄烷酮类化合物的断裂机理以及碎裂片段特征进行研究,通过vDIA对样品成分进行分析,从而实现对葛根保健品中未知功效成分的筛查^[49]。表1所示为DIA近5年用于食品安全、食品功能性成分、食品溯源和真实性分析。

表1 数据非依赖采集在食品分析中的应用

Table 1 Application of data independent acquisition in food analysis

被测物	基质	数据采集方式	仪器	参考文献
农药残留	蔬菜和水果	FS-vDIA	LC-Q-Orbitrap	[8]
塑化剂	果泥和果汁	FS-SWATH	LC-Q-TOF	[38]
食品	婴儿食品和鸡蛋	FS-SWATH	LC-Q-TOF	[39]
安全	鲑鱼	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[40]
分析	香料	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[41]
农药残留	苹果、香蕉、胡萝卜、土豆	FS-mDIA/FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[42]
生物胺	干发酵羊乳香肠	FS-mDIA	UPLC-Q-Orbitrap	[43]

续表 1

被测物	基质	数据采集方式	仪器	参考文献	
农药残留	牛奶和乳制品	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[50]	
农药残留	柠檬,玉米,燕麦	FS-vDIA	GC-MS/MS and UPLC-Q-Orbitrap	[51]	
农药残留	茶叶	FS-SWATH	LC-Q-Orbitrap	[52]	
农药残留	蔬菜和水果	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[53]	
兽药残留	蜂蜜	FS-AIF	LC-Q-TOF	[54]	
兽药残留	牛奶	FS-mDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[55]	
兽药残留	羊肉	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[56]	
真菌毒素	乳制品	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[57]	
真菌毒素	绿茶	FS-mDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[58]	
单核真菌毒素	玉米	FS-SWATH	LC-Q-Orbitrap	[59]	
塑化剂	婴幼儿食品	FS-SWATH	UHPLC-Q-TOF	[60]	
功能 活性 成分 分析	多酚	红酒	FS-SWATH	microLC-TripleTOF	[48]
	葛根素	葛根	FS-vDIA	UPLC-Q-Orbitrap	[49]
	类黄酮	绿茶,葛根,柚子,葡萄籽	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[61]
	异黄酮,氨基酸	大豆	FS-SWATH	UHPLC-Q-TOF	[62]
	多不饱和脂肪酸	鱼油	FS-SWATH	UHPLC-Q-TOF	[63]
食品 真实 性分 析	多肽	牛和猪的明胶	FS-MSE	NanoUPLC-Q-TOF	[45]
	多肽	小虾	FS-SWATH	UPLC-Q-TOF	[46]
	壬酸,癸酸,辛酸, β -胡萝卜素,麦角钙化醇	牛奶	FS-vDIA	UHPLC-Q-Orbitrap	[47]
	谷蛋白	大麦	FS-SWATH	nanoLC-TripleTOF	[64]
	胰蛋白酶肽	肉	FS-SWATH	UHPLC-Q-Orbitrap	[65]
	多肽	苹果	FS-MSE	nanoUPLC-Q-TOF	[66]
	多肽	奶酪	FS-MSE	nanoUHPLC-Q-Orbitrap	[67]
	多肽	鲑鱼	FS-SWATH	LC-Q-TOF	[68]

5 结 论

与传统的定向多反应监测采集和 DDA 相比, DIA 具有如下优势:1) 无需预先指定目标分析物, 数据采集方式简单, 只需根据方法要求定义分子离子隔离窗口大小和每个窗口扫描累积时间两个关键参数; 2) 理论通量无上限, 可重复性高, DIA 是对所有分子离子信息全部覆盖, 避免了 DDA 随机性缺点; 3) 数据可回溯性分析, 可多次深度挖掘样品数据信息。4) 精准定量, 一个采集循环中包括分子离子和碎片离子的信息, 因此可利用分子离子和碎片离子同时定量。

食品基质复杂且包含信息较为丰富, 目前已有不少研究利用 DIA 技术去分析食品安全性、食品功能成分和对食品真实性进行鉴别, 借鉴和参考相关蛋白组学和代

谢组学的分析流程和数据处理软件, 但缺乏自动化数据处理软件去非定向提取复杂食品基质中外源性风险物质和功能活性物质等小分子分析。DIA 采集方法的发展本质依赖仪器技术的进步, 即在获得更高的扫描速率和更高的分辨率前提下实现足够窄的分子离子隔离窗口下信息全覆盖采集, 与此同时还要保证在尽可能较短的色谱梯度下获得较为可信的色谱轮廓峰(一般 10 个数据采集点)以用于定量。在没有获得足够快的仪器扫描速度的前提下, 如何组合不同数据采集方式以实现更高选择性的二级 MS/MS 谱图和对二级 MS/MS 谱图中分子离子与相应碎片离子的溯源关系深度学习是优化 DIA 工作流程的主要方向。

参 考 文 献

- [1] 李博, 侯德峰, 王晓冬, 等. 精检口位置对氮质谱检测漏仪性能的影响研究[J]. 仪器仪表学报, 2020,

- 41(11): 58-65.
- LI B, HOU D F, WANG X D, et al. Study on the influence of the position of precise detection port on the performance of helium mass spectrometer leak detector[J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2020, 41(11): 58-65.
- [2] RAETZ M, BONNER R, HOPFGARTNER G. SWATH-MS for metabolomics and lipidomics: Critical aspects of qualitative and quantitative analysis[J]. Metabolomics, 2020, 16(6): 71.
- [3] 张汉君, 华道柱, 谢远术, 等. 差分真空单颗粒进样在线气溶胶飞行时间质谱系统的研制[J]. 电子测量与仪器学报, 2018, 32(10): 9-14.
- ZHANG H J, HUA D ZH, XIE Y SH, et al. Development of on-line aerosol time of flight mass spectrometry system based on the single particle inlet of differential vacuum [J]. Journal of Electronic Measurement and Instrumentation, 2018, 32(10): 9-14.
- [4] LUDWING C, GILLET L, ROSENBERGER G, et al. Data-independent acquisition-based SWATH-MS for quantitative proteomics: A tutorial [J]. Molecular Systems Biology, 2018, 14: e8126.
- [5] PEREZ-ORTEGA P, LARA-ORTEGA F J, GARCIA-REYES J, et al. Screening of over 600 pesticides, veterinary drugs, food-packaging contaminants, mycotoxins and other chemicals in food by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOFMS) [J]. Talanta, 2016, 160: 704-712.
- [6] GILLET L C, NAVARRO P, TATE S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: A new concept for consistent and accurate proteome analysis [J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2012, 11(6): O111.016717.
- [7] PENA-HERRERA J M, MONTEMURRO N, BARCELO D, et al. Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system [J]. Talanta, 2019, 199: 370-379.
- [8] ZOMER P, MOL H G J. Simultaneous quantitative determination, identification and qualitative screening of pesticides in fruits and vegetables using LC-Q-Orbitrap (TM)-MS [J]. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2015, 32: 1628-1636.
- [9] EGERTSON J D, KUEHN A, MERRIHEW G E, et al. Multiplexed MS/MS for improved data-independent acquisition [J]. Nature Methods, 2013, 10 (8): 744-748.
- [10] WU I L, TURNIPSEED S B, STOREYJ M, et al. Comparison of data acquisition modes with Orbitrap high-resolution mass spectrometry for targeted and non-targeted residue screening in aquacultured eel [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2020, 34 (7): e8642.
- [11] KIND T, TSUGAWA H, CAJKA T, et al. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search [J]. Mass Spectrometry Reviews, 2018, 37(4): 513-532.
- [12] SANTOS M D M, CAMILLO-ANDRADE A C, KURT L U, et al. Mixed-data acquisition: Next-generation quantitative proteomics data acquisition [J]. Journal of proteomics, 2020, 222: 103803.
- [13] GUAN S H, TAYLOR P P, HAN Z W, et al. Data dependent-independent acquisition (DDIA) proteomics [J]. Journal of Proteome Research, 2020, 19 (8): 3230-3237.
- [14] SUN F F, TAN H G, LI Y S, et al. An integrated data-dependent and data-independent acquisition method for hazardous compounds screening in foods using a single UHPLC-Q-Orbitrap run [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 401: 123266.
- [15] PANCHAUD A, SCHERL A, SHAFFER S A, et al. Precursor acquisition independent from ion count: How to dive deeper into the proteomics ocean [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81: 6481-6488.
- [16] 张伟, KIYONAMI R, 江峥, 等. 创新数据非依赖性采集用于复杂基质目标蛋白质的定量分析 [J]. 分析化学, 2014, 42: 1750-1758.
- ZHANG W, KIYONAMI R, JIANG ZH, et al. Quantification analysis of targeted proteins in complex sample by novel data independent acquisition [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42: 1750-1758.
- [17] ZHANG F F, GE W G, RUAN G, et al. Data-independent acquisition mass spectrometry-based proteomics and software tools: A Glimpse in 2020 [J]. Proteomics, 2020, 20(17-18): 1900276.
- [18] TIWARY S, LEVY R, GUTENBRUNNER P, et al. High-quality MS/MS spectrum prediction for data-dependent and data-independent acquisition data analysis [J]. Nature Methods, 2019, 16(6): 519-527.
- [19] ZHOU X X, ZENG W F, CHI H, et al. MS/MS spectrum prediction for modified peptides using pDeep2 trained by transfer learning [J]. Analytical Chemistry,

- 2017, 89(23): 12690-12697.
- [20] TSOU C C, AVTONOMOV D, LARSEN B, et al. DIA-Umpire: Comprehensive computational framework for data-independent acquisition proteomics[J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 258-271.
- [21] TING Y S, EGERTSON J D, BOLLINGER J G, et al. PECAN: Library-free peptide detection for data-independent acquisition tandem mass spectrometry data[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(9): 903-912.
- [22] MEYER J G, MUKKAMALLA S, STEEN H, et al. PIQED: Automated identification and quantification of protein modifications from DIA-MS data [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7): 646-647.
- [23] WANG J, TUCHOLSKA M, KNIGHT J D R, et al. MSPLIT-DIA: Sensitive peptide identification for data-independent acquisition [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(12): 1106-1108.
- [24] TRAN N H, QIAO R, XIN L, et al. Computationally instrument-resolution-independent de novo peptide sequencing for high-resolution devices [J]. *Nature Methods*, 2019, 16(1): 63-68.
- [25] SMITH C A, WANT E J, O'MAILLE G, et al. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification[J]. *Analytical Chemistry*, 2006, 78(3): 779-787.
- [26] ROST H L, SACHSENBERG T, AICHE S, et al. OpenMS: A flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(9): 741-748.
- [27] TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, et al. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(6): 523-531.
- [28] WANG R H, YIN Y D, ZHU Z J. Advancing untargeted metabolomics using data-independent acquisition mass spectrometry technology[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(19): 4349-4357.
- [29] WONG J W, WANG J, CHOW W, et al. Perspectives on liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide screening in foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(37): 9573-9581.
- [30] JIA W, SHI L, CHU X G. Untargeted screening of sulfonamides and their metabolites in salmon using liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2018, 239: 427-433.
- [31] XU L L, YOUNG A, ZHOU A, et al. Machine learning in mass spectrometric analysis of DIA Data [J]. *Proteomics*, 2020, 20(21-22): 1900352.
- [32] GUO Z Q, ZHU Z G, HUANG S, et al. Non-targeted screening of pesticides for food analysis using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry-a review [J]. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2020, 37(7): 1180-1201.
- [33] SULYOK M, STADLER D, STEINER D, et al. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: Challenges and solutions [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(11): 2607-2620.
- [34] DURAK B Y, CHORMEY D S, FIRAT M, et al. Validation of ultrasonic-assisted switchable solvent liquid phase microextraction for trace determination of hormones and organochlorine pesticides by GC-MS and combination with QuEChERS [J]. *Food Chemistry*, 2020, 305: 125487.
- [35] CABALLERO-CASERO N, BELOVA L, VERVLIET P, et al. Towards harmonised criteria in quality assurance and quality control of suspect and non-target LC-HRMS analytical workflows for screening of emerging contaminants in human biomonitoring[J]. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 136: 116201.
- [36] FISHER C M, CROLEY T R, KNOLHOFF A M. Data processing strategies for non-targeted analysis of foods using liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry[J]. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2021, 136: 116188.
- [37] 贾玮, 张荣, 石琳, 等. 基于二维色谱及其联用技术筛查乳及乳制品中外源性风险物质的分析方法研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(23): 339-345.
- JIA W, ZHANG R, SHI L, et al. Research progress of screening methods of exogenous risk substances in milk and dairy products based on two-dimensional chromatography and its combination [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(23): 339-345.
- [38] RAMOS M J G, LOZANO A, FERNANDEZ-ALBA A R. High-resolution mass spectrometry with data independent acquisition for the comprehensive non-targeted analysis of migrating chemicals coming from multilayer plastic packaging materials used for fruit puree and juice [J]. *Talanta*, 2019, 191: 180-192.
- [39] VAZQUE Z P P, LOZANO A, FERRER C, et al. Improvements in identification and quantitation of

- pesticide residues in food by LC-QTOF using sequential mass window acquisition (SWATH (R)) [J]. *Analytical Methods*, 2018, 10(24): 2821-2833.
- [40] JIA W, CHU X G, CHANG J, et al. High-throughput untargeted screening of veterinary drug residues and metabolites in tilapia using high resolution orbitrap mass spectrometry[J]. *Analytical Chimica Acta*, 2017, 957: 29-39.
- [41] GOON A, KHAN Z, OULKAR D, et al. A simultaneous screening and quantitative method for the multiresidue analysis of pesticides in spices using ultra-high performance liquid chromatography-high resolution (Orbitrap) mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017: 1532, 105-111.
- [42] WANG J, CHOW W, WONG J W, et al. Non-target data acquisition for target analysis (nDATA) of 845 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(7): 1421-1431.
- [43] JIA W, ZHANG R, SHI L, et al. Effects of spices on the formation of biogenic amines during the fermentation of dry fermented mutton sausage [J]. *Food Chemistry*, 2020, 321: 126723.
- [44] MIHAILOVA A, KELLY S D, CHEVALLIERO P, et al. High-resolution mass spectrometry-based metabolomics for the discrimination between organic and conventional crops: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 110: 142-154.
- [45] YILMAZ M T, KESMEN Z, BAYKAL B, et al. A novel method to differentiate bovine and porcine gelatins in food products: NanoUPLC-ESI-Q-TOF-MSE based data independent acquisition technique to detect marker peptides in gelatin [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141: 2450-2458.
- [46] HU L P, ZHANG H W, ZHANG X M, et al. Identification of peptide biomarkers for discrimination of shrimp species through SWATH-MS-Based proteomics and chemometrics [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(40): 10567-10574.
- [47] JIA W, DONG X Y, SHI L, et al. Discrimination of milk from different animal species by a foodomics approach based on high-resolution mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(24): 6638-6645.
- [48] MA Y, TANAKA N, VANIYA A, et al. Ultrafast polyphenol metabolomics of red wines using microLC-MS/MS [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 64(2): 505-512.
- [49] 贾玮, 刘余阳, 石琳, 等. 基于特征碎裂片段的葛根保健品中功效成分非定向筛查方法构建 [J]. *分析测试学报*, 2019, 38(6): 635-642.
- JIA W, LIU Y Y, SHI L, et al. Non-directive screening for functional components in food supplements of pueraria based on characteristic fragmentation [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2019, 38(6): 635-642.
- [50] 贾玮, 张荣, 石琳, 等. 基于质谱断裂机理的乳制品中农药非定向筛查分析方法构建 [J]. *分析化学*, 2019, 47(7): 1098-1105.
- JIA W, ZHANG R, SHI L, et al. Construction of non-target screening method for pesticides in milk and dairy products based on mass spectrometry fracture mechanism [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(7): 1098-1105.
- [51] FENG C, XU Q, QIU X L, et al. Comprehensive strategy for analysis of pesticide multi-residues in food by GC-MS/MS and UPLC-Q-Orbitrap [J]. *Food Chemistry*, 2020, 320: 126576.
- [52] WANG F Q, LI S H, FENG H, et al. An enhanced sensitivity and cleanup strategy for the nontargeted screening and targeted determination of pesticides in tea using modified dispersive solid-phase extraction and cold-induced acetonitrile aqueous two-phase systems coupled with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 530-538.
- [53] WANG J, CHOW W, CHANG J, et al. Development and validation of a qualitative method for target screening of 448 pesticide residues in fruits and vegetables using UHPLC/ESI Q-Orbitrap based on data-independent acquisition and compound database [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(2): 473-493.
- [54] VON EYKEN A, FURLONG D, AROONI S, et al. Direct injection high performance liquid chromatography coupled to data independent acquisition mass spectrometry for the screening of antibiotics in honey [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2019, 27(3): 679-691.
- [55] WANG J, LEUNG D, CHOW W, et al. UHPLC/ESI Q-Orbitrap quantitation of 655 pesticide residues in fruits and vegetables-A companion to an nDATA working flow [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(22): 5373-5389.
- [56] 贾玮, 徐曦, 石琳, 等. 基于质谱裂解机理的深加工羊肉制品中兽药残留非定向筛查技术研究 [J]. *分析测试学报*, 2019, 38(10): 1179-1186.

- JIA W, XU X, SHI L, et al. Non directional screening of veterinary drug residues in deep processed lamb products based on mass spectrometry fragmentation [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2019, 38 (10): 1179-1186.
- [57] 贾玮, 樊子便, 杜安, 等. 基于质谱特征碎裂片段的乳制品中真菌毒素非定向筛查方法研究[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(6): 705-714.
- JIA W, FAN Z B, DU AN, et al. Non-directional screening of mycotoxins in dairy products based on mass spectrometry characteristic fragments [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2020, 39(6): 705-714.
- [58] JIA W, SHI L, ZHANG F, et al. Multiplexing data independent untargeted workflows for mycotoxins screening on a quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry platform[J]. *Food Chemistry*, 2019, 278: 67-76.
- [59] RENAUD J B, SUMARAH M W. Data independent acquisition-digital archiving mass spectrometry: Application to single kernel mycotoxin analysis of *Fusarium graminearum* infected maize[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(12): 3083-3091.
- [60] BAUER A, JESUS F, RAMOS M J G, et al. Identification of unexpected chemical contaminants in baby food coming from plastic packaging migration by high resolution accurate mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 274-288.
- [61] JIA W, SHI L, ZHANG F, et al. High-throughput mass spectrometry scheme for screening and quantification of flavonoids in antioxidant nutraceuticals [J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1608: 460408.
- [62] CHIEN H J, WANG C S, CHEN Y H, et al. Rapid determination of isoflavones and other bioactive compounds in soybean using SWATH-MS[J]. *Analytical Chimica Acta*, 2019, 1103: 122-133.
- [63] SCHLOTTERBECK J, CEB M, KOLB A, et al. Quantitative analysis of chemoresistance-inducing fatty acid in food supplements using UHPLC-ESI-MS/MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(2): 479-491.
- [64] COLGRAVE M L, BYRNE K, BLUNDELL M, et al. Comparing multiple reaction monitoring and sequential window acquisition of all theoretical mass spectra for the relative quantification of barley gluten in selectively bred barley lines[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(18): 9127-9135.
- [65] ORDUNA A R, HUSBY E, YANG C T, et al. Detection of meat species adulteration using high-resolution mass spectrometry and a proteogenomics strategy [J]. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2017, 34(7): 1110-1120.
- [66] BUTS K, MICHIELSENS S, HERTOOG M, et al. Improving the identification rate of data independent label-free quantitative proteomics experiments on non-model crops: A case study on apple fruit[J]. *Journal of Proteomics*, 2014, 105: 31-45.
- [67] ARJU G, TAIVOSALO A, PISMENNOI D, et al. Application of the UHPLC-DIA-HRMS method for determination of cheese peptides [J]. *Foods*, 2020, 9(8): 979.
- [68] FIORINO G M, FRESCH M, BRUMMER I, et al. Mass spectrometry-based untargeted proteomics for the assessment of food authenticity: The case of farmed versus wild-type salmon [J]. *Journal of AOAC International*, 2019, 102(5): 1339-134

作者简介



杜安, 2020 年于陕西科技大学获得学士学位, 现为陕西科技大学食品与生物工程学院硕士研究生, 主要研究方向为食品安全与质量控制。

E-mail: 1936689174@qq.com

Du An received his B. Sc. degree in 2020 from Shaanxi University of Science and Technology. Now, he is a master student in school of food and biological engineering, Shaanxi University of Science and Technology. His main research interests include Food safety and quality control.



贾玮 (通信作者), 2010 年于陕西科技大学获得学士学位, 2013 年于陕西科技大学 & 中国检验检疫科学研究院获得硕士学位, 2016 年于陕西科技大学 & 中国检验检疫科学研究院获得博士学位, 现为陕西科技大学副教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品安全与质量控制, 食品真实性溯源, 农产品加工与贮藏。

E-mail: jiawei@sust.edu.cn

Jia Wei (Corresponding author) received his B. Sc. degree in 2010 from Shaanxi University of Science and Technology, received his M. Sc. degree in 2013 from Shaanxi University of Science and Technology & Chinese Academy of Inspection and Quarantine, received his Ph. D. degree in 2016 from Shaanxi University of Science and Technology & Chinese Academy of Inspection and Quarantine. He is currently an associate professor and a Ph. D. advisor at Shaanxi University of Science and Technology. His main research interests include Food safety and quality control, food authenticity traceability, agricultural products processing and storage.