

# 使用精确质量四极杆-飞行时间液质联用系统和分子结构关联软件对三氯蔗糖进行鉴定和碎裂研究

## 应用简报

食品与环境

### 作者

Imma Ferrer 和 E. Michael Thurman

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 80309

Jerry Zweigenbaum

安捷伦科技公司

2850 Centerville Road

Wilmington, DE 19808

### 摘要

本文将评价精确质量四极杆-飞行时间液质联用系统 (Q-TOF LC/MS) 和 MS/MS 系统在正负电喷雾离子化 (ESI) 模式下对水中三氯蔗糖的鉴定。研究其响应和碎裂途径。Q-TOF LC/MS 系统在 ESI 正离子或负离子模式下对三氯蔗糖具有良好的响应。正离子模式下获得的整体信号强度大约是负离子模式下的两倍。

在正离子模式下, 三氯蔗糖以其钠加合物  $[M+Na]^+$  的形式在  $m/z$  419.0038 处检出。通过精确质量 MS/MS 测量提供所获得的钠加合碎片离子 ( $m/z$  221.0187 和  $m/z$  238.9848) 的结构信息。在负离子模式下观察到去质子化分子 ( $m/z$  395.0073 处的  $[M-H]^-$ )。通过 MS/MS 碎裂产生一个特征碎片离子 ( $m/z$  359.0306)。使用 Agilent MassHunter 分子结构关联 (MSC) 软件绘制和研究正负离子 MS/MS 分析的碎裂途径。MSC 软件已证实在辅助碎片离子结构的表征上是一个有效工具。



Agilent Technologies

## 前言

三氯蔗糖由于其甜度高、热量低、生物体内积累少、毒性低并且能够满足许多消费者的饮食需求而成为全球最受欢迎的人工甜味剂。三氯蔗糖在人体内不参与代谢，因此最终会进入到废水以及地表水中。目前的废水处理技术无法对三氯蔗糖进行有效处理，所以，它如今在环境中是无所不在。这正是我们需要重点关注的问题。当前研究揭示了三氯蔗糖在水生环境中的生物效应，这种效应可能会产生严重的毒性作用 [1]。由于以上原因，对饮用水、地下水、地表水、废水和水生环境中三氯蔗糖的测定已引起了人们日益增长的兴趣。

由于三氯蔗糖的溶解性，很容易对其进行 LC/MS 分析。由于它含有三个氯原子，采用质谱分析时会产生独特的氯原子信号。从许多已发表的关于三氯蔗糖分析的论文中，我们发现采用负离子多反应监测 (MRM) 模式的 LC/MS/MS 系统是最常用的方法。然而，所使用的 MRM 离子对的选择性还不足以鉴定水中三氯蔗糖，在可信度方面不如精确质量技术。这些离子对之所以不具有鉴别能力是因为它们涉及的氯丢失在许多其他常见有机分子中。

本文将评估 Agilent 6540 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统在正负 ESI 模式下对水中三氯蔗糖的确定性鉴定。本文还将研究分子结构关联软件的应答和有效性。《分析化学》杂志上发表的《关于水中三氯蔗糖检测的分析方法》[2] 作为一份补充性的研究，详细比较了 Q-TOF LC/MS 和 LC/MS/MS 这两种系统在检测环境水样中三氯蔗糖方面的性能。

## 实验

关于实验流程的详细说明可参见刊登在《分析化学》杂志上的补充性论文 [2]。

### 标准溶液的制备

三氯蔗糖购自 Sigma-Aldrich 公司（美国密苏里州圣路易斯）。以水为溶剂制备 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的三氯蔗糖储备液，并置于  $-18^\circ\text{C}$  下保存。取该储备液适量，用甲醇和水稀释制得标准工作液。

### 仪器

采用 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱与 Agilent 6540 精确质量 Q-TOF 的 LC/MS 联用系统，配备安捷伦喷射流技术的电喷雾离子源，对标准液进行分析。

高效液相色谱 (HPLC) 配备有一个集成了真空脱气机 (G4220A) 的二元泵和自动进样器 (G4226A)。HPLC 参数见表 1。

表 1. HPLC 参数

仪器	Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统
流动相	(A) 乙腈 (B) 0.1% 甲酸水溶液
梯度	线性：初始流动相组成为 10% A，保持 1.7 分钟，然后以线性梯度增加至 100% A，总运行时间为 10 分钟
流速	0.4 mL/min
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 反向分析柱， 50 $\times$ 2.1 mm, 1.8 $\mu\text{m}$ 粒径 (部件号 959741-902)
柱温	25 $^\circ\text{C}$
进样量	20 $\mu\text{L}$

在 2 GHz 下记录质量范围为 30–1000  $m/z$  的 Q-TOF MS 精确质量谱图。不采用极性切换；进样两次，一次在正离子模式下进样，另一次在负离子模式下进样。同时也在正负离子模式下开展 MS/MS 实验。Q-TOF MS 和 MS/MS 参数见表 2。

表 2. Q-TOF MS 与 MS/MS 参数

仪器	Agilent 6540 精确质量 Q-TOF LC/MS 系统
电离模式	采用安捷伦喷射流技术的正/负电喷雾离子源
质量范围	30–1000 $m/z$ (扩展动态范围 2 GHz)
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	10 L/min
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
雾化器压力	45 psi
锥孔电压	65 V
八极杆射频电压	750 V
碎裂电压	190 V
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	1500 V (负离子模式) 或 0 V (正离子模式)
MS/MS 参数	
目标 MS/MS	母离子：钠加合离子 (正离子) 和去质子化分子 (负离子)
分离峰宽	中等 (约 4 $m/z$ )
碰撞能量	10、20 和 40 eV

由外部四元泵提供含内部参比质量的参比溶液 (正离子模式下嘌呤  $C_5H_4N_4$  的  $m/z$  121.0509 和 HP-921 [六 ( $^1H, ^1H, ^3H$ -四氟代戊氧基)磷腈]  $C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$  的  $m/z$  922.0098, 以及负离子模式下前者的  $m/z$  119.0363 和后者的甲酸盐加合物  $m/z$  966.0007)。

每日检查质量数准确度的稳定性，如果数值误差超出 2 ppm，则需要重新校准仪器。

## 数据分析

采用 Agilent MassHunter 工作站软件处理 Q-TOF MS 的精确质量和 MS/MS 数据。使用 Agilent MassHunter 分子结构关联 (MSC) 软件，绘制和研究正负离子 MS/MS 分析的碎裂途径。

## 结果和讨论

### Q-TOF LC/MS 系统分析结果

图 1 所示为使用 Q-TOF LC/MS 系统在 ESI 正负离子模式下所获得的三氯蔗糖标准液质谱图。在负离子模式下 (图 1A)，三氯蔗糖分子丢失质子，形成具有精确质量  $m/z$  395.0073 的基峰 (质量数误差 0.0 ppm)。 $m/z$  397.0045 和 399.0018 离子对应的是含  $Cl-37$  同位素的三氯蔗糖。

在正离子模式下 (图 1B)，三氯蔗糖分子钠加合离子，形成测定的精确质量为  $m/z$  419.0040 的离子。测定的质量数在理论精确质量  $m/z$  419.0038 的 0.5 ppm 范围内。在这种情况下，质子化分子未形成。两个氯同位素位于  $m/z$  421.0012 和 422.9988 处。

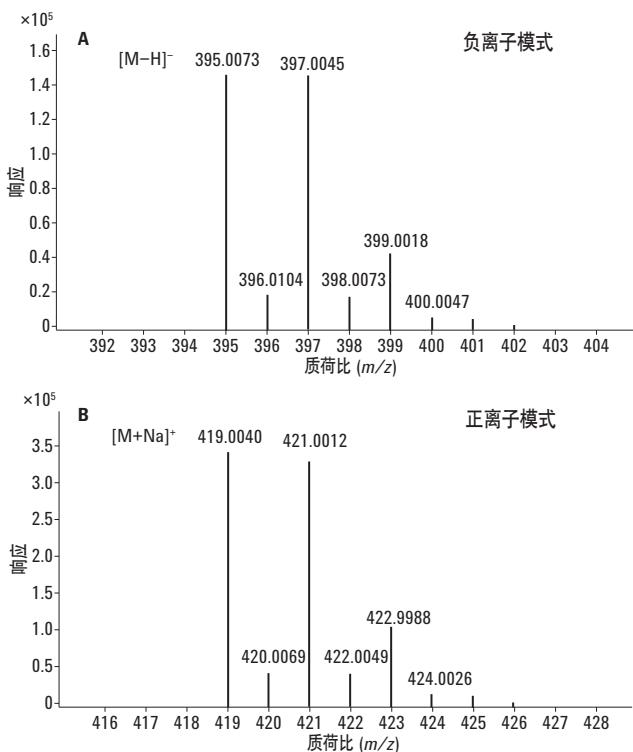


图 1. 使用 Q-TOF LC/MS 系统分别在负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下分析三氯蔗糖所得的结果，其中显示了测定的精确质量数。在正离子模式下，三氯蔗糖以其钠加合物  $[M+Na]^+$  的形式在  $m/z$  419.0040 处得以检出。在负离子模式下观察到  $m/z$  395.0073 处的去质子化分子  $[M-H]^-$

由于三氯蔗糖分子富含氢原子，必要时会发生质子迁移，因此带电的钠离子能经受中性丢失。这种碎裂模式可称为钠迁移碎裂，平常极其少见，因为据了解钠加合物很难（如果有可能）经过碎裂产生有结构意义的离子 [2]。对于钠加合物的 ESI 分析，这种现象报道不多，并且在使用 ESI 正离子模式化检测三氯蔗糖时被忽视了。

图 2 显示了正负 ESI Q-TOF LC/MS 系统分析三氯蔗糖标准液所得信号的差异。正离子模式下获得的信号强度大约是负离子模式下的两倍。同样，信噪比也略优于负离子模式下的信噪比，因为背景离子的丰度较低。

图 3 显示了通过 Q-TOF MS/MS 使三氯蔗糖钠加合物碎裂（正离子模式）而得的精确质量谱图。获得两个特征质量： $m/z$  221.0190 和 238.9853。

### 推断的 MS/MS 碎裂途径

图 4 显示了由正负离子 MS/MS 所推断的碎裂途径。在正离子模式下，钠加合的三氯蔗糖离子分裂为两个糖碎片，这两种碎片均保留了钠离子。钠离子迁移到该分子的葡萄糖端或果糖端，从而获得  $m/z$  221.0187 和 238.9848 离子。在负离子模式下分析，三氯蔗糖经过碎裂丢失了 HCl，从而获得  $m/z$  359.0306 离子。采用 Q-TOF 精确质量测量技术和 MSC 软件可轻松确认化学结构。

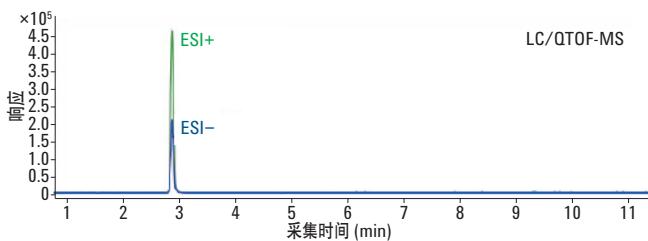


图 2. 使用 Q-TOF LC/MS 系统分析三氯蔗糖标准液，比较在正负离子模式下所获得的信号强度

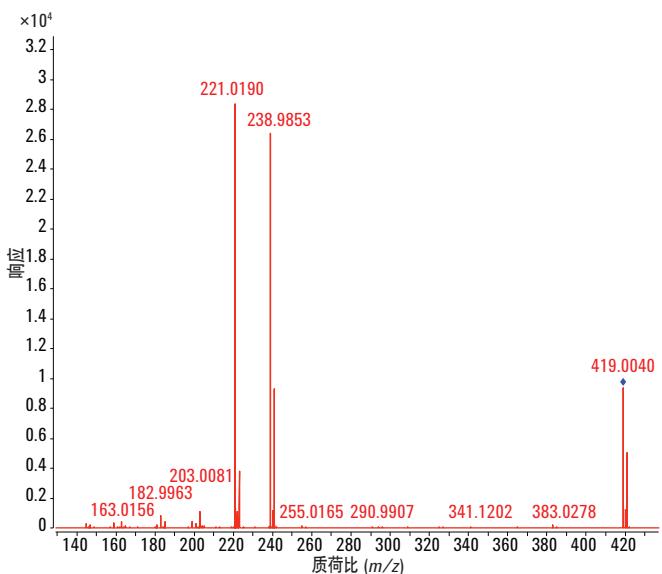


图 3. 三氯蔗糖钠加合物的精确质量 MS-MS 谱图（正离子模式）

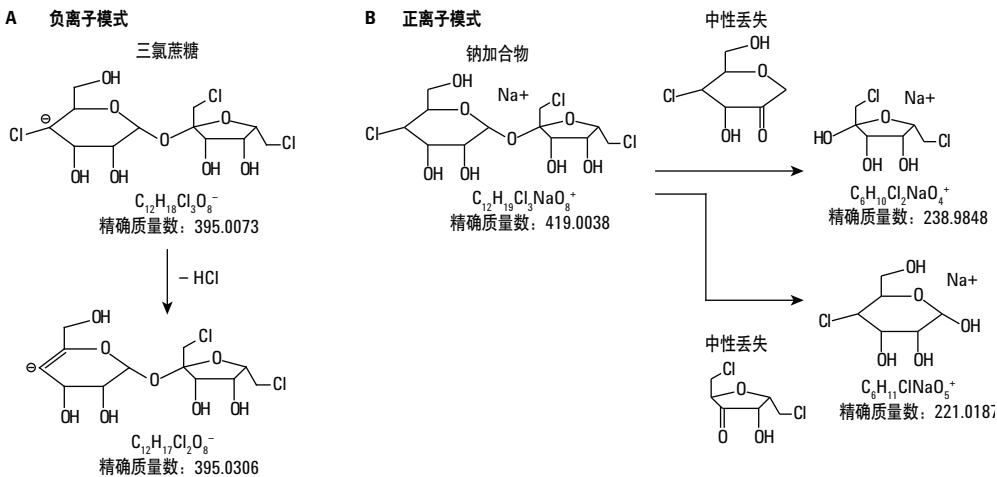


图 4. 根据推断得出的正负离子模式下 MS/MS 对三氯蔗糖的碎裂途径，其中显示了精确质量数

如图 5 和图 6 所示, 碎裂途径可通过 MSC 软件进行研究。该软件将目标化合物的 MS/MS 碎片离子精确质量与该化合物存在的一种或多种推测分子结构进行关联。为此, 通过“系统性键断裂”方法 MSC 将尝试用已观察到的各个碎片离子去解释推测的结构。

需要输入到 MSC 软件的信息包括 MS/MS 精确质量碎片谱图、目标化合物的分子式, 以及候选的分子结构。用户可以手动输入分子式或结构, 或者从所有可能的分子式中选择最有可能的结构, 候选的分子式是 MSC 使用精确质量 MS 和 MS/MS 信息计算得出的。然后, MSC 将使用所选的分子式, 从 .mol 文件、.sdf 文件、MassHunter 化合物数据库 (PCD、PCDL) 或 ChemSpider (通过互联网) 获取一个或多个可能的结构, 并根据各个候选结构与 MS/MS 谱图的关联性进行评分。

由于 MSC 软件目前无法处理钠加合离子, 因此有必要绘制钠位于葡萄糖环上的三氯蔗糖结构; 上部结构如图 5 的中图所示。碎片离子显示在最右侧。在最右侧的表格中, 用蓝色突出的那一行显示了测定的  $m/z$  221.0189 质量数, 其对应的是推测的碎片离子结构。

MSC 软件还绘制了钠位于果糖环上的三氯蔗糖结构 (图 6)。在最右侧的方框中, 三氯蔗糖分子的突出部分所显示的  $m/z$  238.9852 碎片离子为唯一可能的结构 (碎片结构上方的表格中的蓝色突出显示行)。

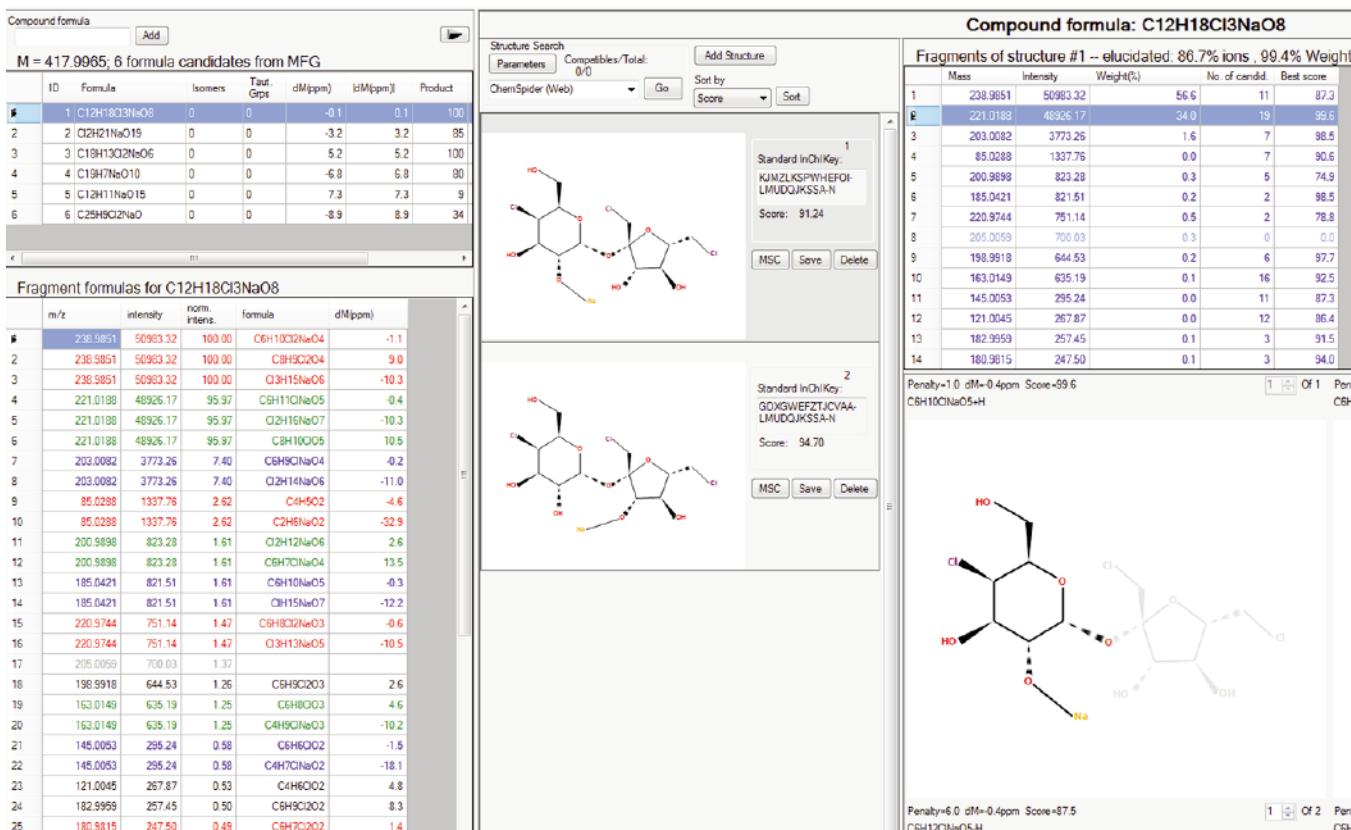


图 5. 通过 MSC 分析显示钠位于葡萄糖环上的三氯蔗糖的钠化分子碎片

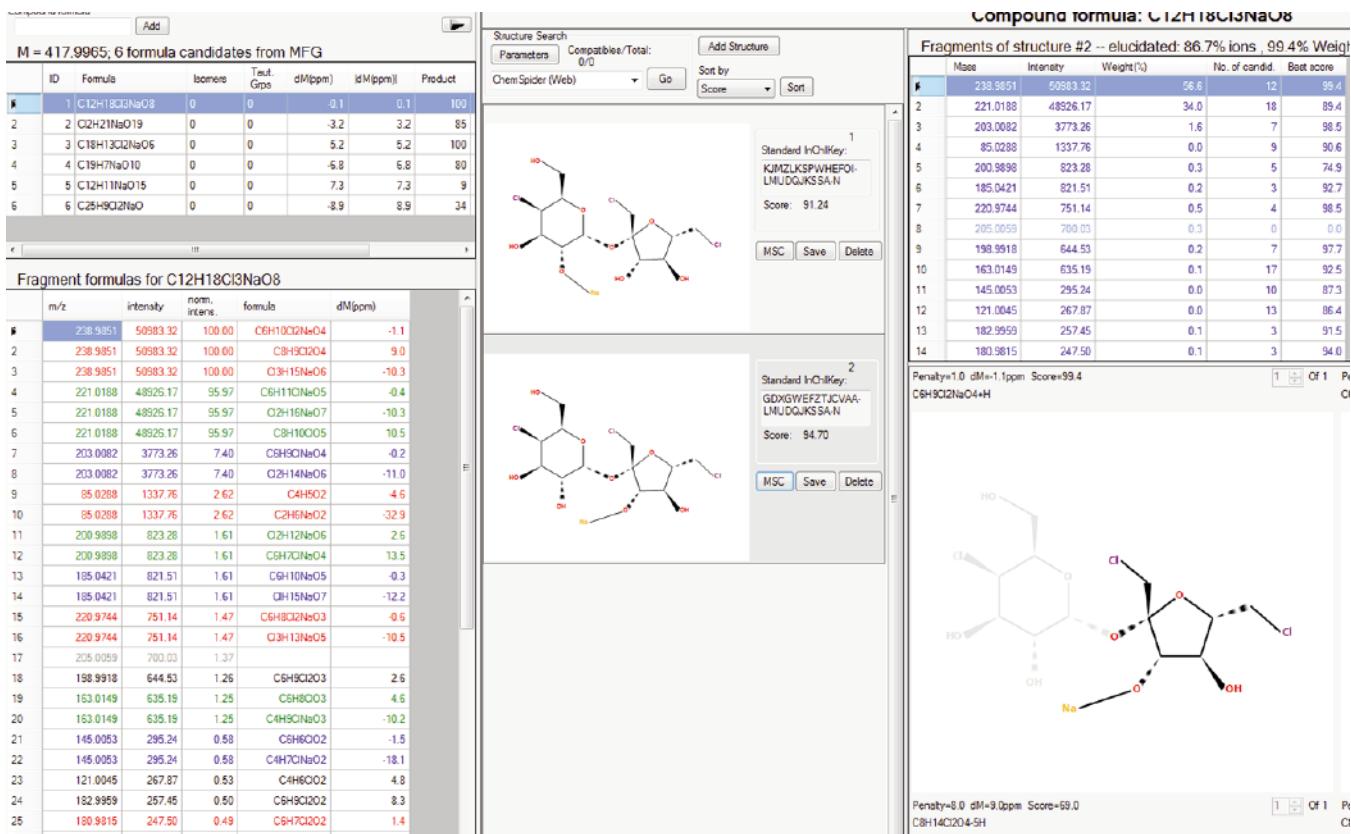


图 6. 通过 MSC 分析显示钠位于果糖环上的三氯蔗糖的钠化分子碎片

图 7 所示为负离子模式下三氯蔗糖的 Q-TOF MS/MS 谱图。

$m/z$  359.0307 离子代表丢失了 HCl, 它是此化合物的主要碎片离子。

$m/z$  231.9874 离子是复杂重排的三氯蔗糖碎片。

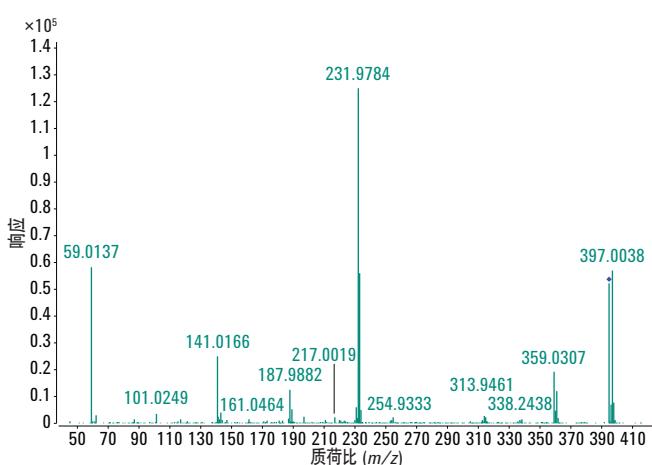


图 7. 三氯蔗糖的 MS/MS 谱图 (负离子模式)

图 8 所示为  $m/z$  359.0307 碎片离子的 MSC 分析结果。两种结构都与丢失 HCl 相符。ChemSpider 中的许多结构与三氯蔗糖的结构相匹配；然而，在 MSC 软件中三氯蔗糖若想获得首位匹配需要按参考文献编号排列结构，而不是按兼容性评分进行排序（图 8 中的红色箭头）。

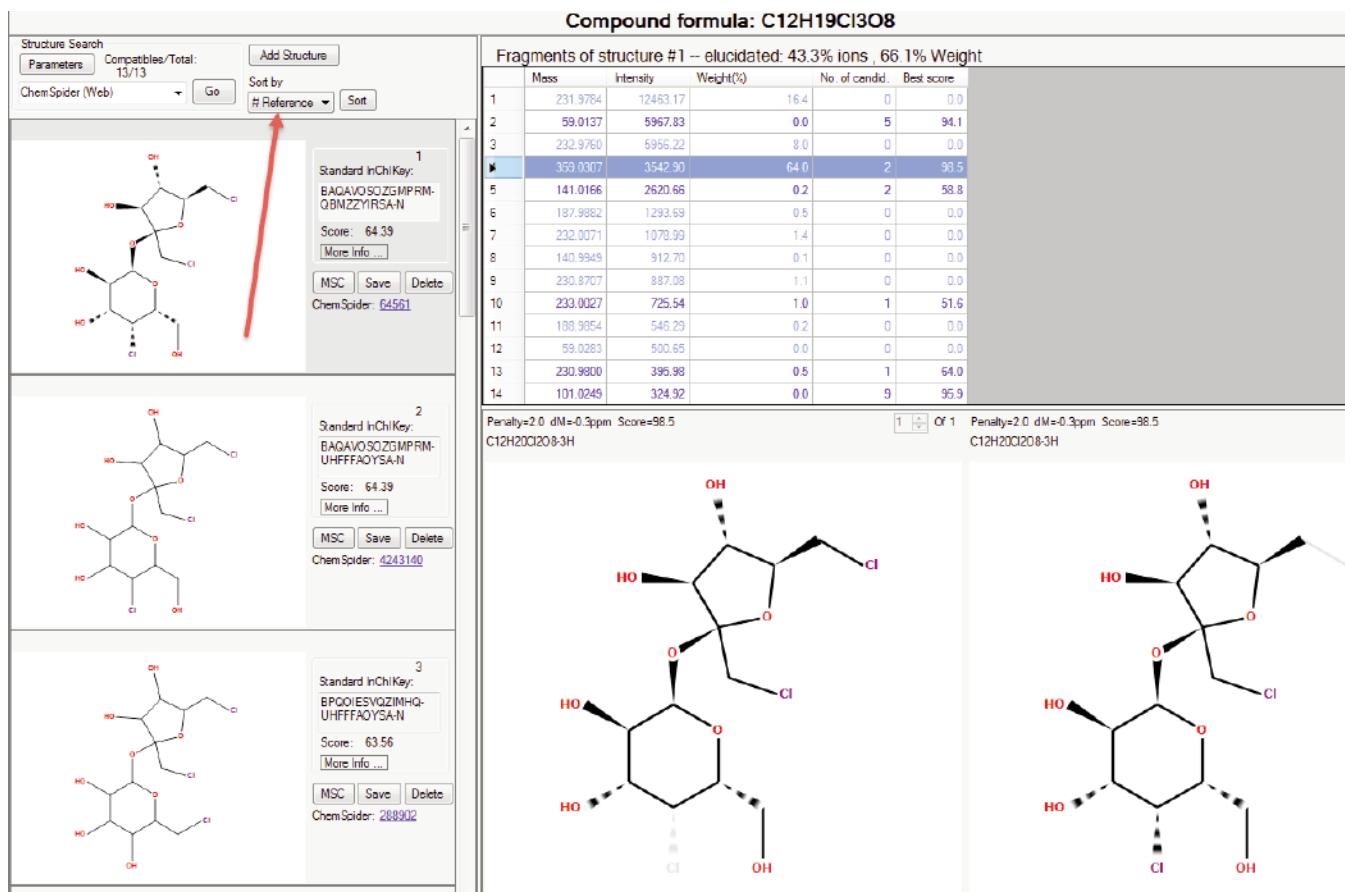


图 8. 使用 MSC 分析负离子模式下所获得的 Q-TOF MS/MS 谱图。当搜索 ChemSpider 时，所有结构的得分相同。按参考文献编号（参考号）排序，三氯蔗糖位居第一（最上方）（见红色箭头）

## 结论

Q-TOF LC/MS 系统在 ESI 正离子或负离子模式下对三氯蔗糖具有良好的响应。三氯蔗糖在正离子模式下形成强的钠加合物离子，而在负离子模式下容易丢失质子。正离子模式下获得的整体信号强度大约是负离子模式下的两倍。正如关于水中三氯蔗糖检测方法学的补充性研究所证实，使用三重四极杆 LC/MS MRM 方法，在正离子模式下（使用本应用简报中显示的两个离子对）获得的分析灵敏度高于负离子模式 [2]。

不同于一般的钠加合物 ESI 分析报告，正离子模式下形成的强钠加合物很容易发生 MS/MS 碎裂。所产生的两种特征精确质量碎片可用于明确鉴定三氯蔗糖。MSC 软件在辅助碎片离子结构的表征方面是有效的工具。

## 参考文献

1. A.K.E Wiklund, M. Breitholtz, B.E. Bengtsson, and M. Adolfsson-Erici "Sucralose – An ecotoxicological challenger?" *Chemosphere* 2012, **86**, 50–55
2. I. Ferrer, J.A. Zweigenbaum, and E.M. Thurman "Analytical Methodologies for the Detection of Sucralose in Water" *Analytical Chemistry* 2013, **85**, 9581–9587

## 获取更多的信息

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

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦公司对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2014  
2014 年 3 月 6 日, 中国印刷  
5991-4066CHCN



Agilent Technologies