

使用 UHPLC/Q-TOF MS 和精确质量数据库与谱库筛查和鉴定污水处理厂出水中的新兴污染物

应用简报

环境，新兴污染物，水，精确质量筛查，农药，PPCP

作者

Jean Daniel Berset
水与土壤保护实验室 (WSPL)
Bern, Switzerland

Emma Rennie
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, CA, USA

Thomas Glauner
安捷伦科技有限公司
Waldbronn, Germany

摘要

本应用简报介绍了相关环境污染物精确质量谱库的创建及其在筛查城市污水处理厂 (WWTP) 出水中农药、药物和个人护理用品及其代谢物和转化产物中的应用。将 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 液质联用系统结合，使用双喷雾喷射流技术在正离子和负离子电喷雾模式下操作。在一种或两种离子化模式下采集大量潜在环境污染物的精确质谱图，并采集所有相关离子形态的精确质谱图。

在三个半月内采集中欧四家污水处理厂的样品，并使用包含 390 种污染物的参比标样的目标物筛查方法对样品进行分析。此外，使用 Agilent MassHunter 水质筛查个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 中所含的所有化合物作为疑似污染物列表进行广泛的疑似污染物筛查。使用全离子 MS/MS 以及自动 MS/MS 采集和目标物列表对样品进行测量。结果清晰地显示了两种采集模式与高效数据分析工作流程相结合的价值以及用于监测筛查复杂环境样品中潜在污染物的水质筛查 PCDL 的内在价值。



Agilent Technologies

前言

当前，世界各地的环境法规都重点监测数量有限的已知污染物，这些污染物被认为具有显著的生态和人体健康相关风险 [1]。因此，有进一步降低重点污染物环境质量标准 (EQS) 最大容许浓度的趋势。例如，在欧洲，欧盟指令 2013/39/EU 规定了 41 种重点物质或物质组的环境质量标准，其中包括农药、全氟化碳 (PFC)、壬基酚、辛基酚、多溴代阻燃剂、二恶英与 PCB、多环芳烃 (PAH) 以及重金属 [2]。然而，这些重点污染物仅代表所使用且随后在环境中发现的人造化学品的一小部分。除欧盟针对地表水中潜在污染物检测筛查的法规要求以外，人们日益关注对新兴污染物发生数据的收集。这体现在一些国家特定的政府法规中，例如关于水、土壤和沉积物中药物和个人护理用品分析的 EPA 方法 1694 [3] 以及 2015 年发布的第四版美国国家环境保护局污染物候选物列表 (CCL) [4]。

大多数人为污染物由于在污水处理厂 (WWTP) 中处理不完全而进入水生环境中。同时，在生物污水处理过程中形成降解和转化产物。这些产物通常没有得到监测，甚至常常不为人知 [5,6]。污水处理厂下游的地表水中包含无数痕量浓度的人为污染物及其转化产物。当河水随后被用作生产饮用水的水源（称作计划外间接饮用性重复利用）时，全面获取与水的化学品质有关的数据至关重要。气候变化、人口增长和水资源短缺而导致计划内间接和直接饮用性再利用成为常见做法 [7]，在此背景下全面获取与水的化学品质相关的数据变得愈发重要。

由于当前环境法规要求进行全面筛查，并且人们对新兴污染物存在状况的关注日益增加，靶向分析方法越来越多地通过使用高分辨率精确质量数 Q-TOF LC/MS 的非靶向采集方法进行补充。安捷伦 Q-TOF 液质联用仪能够以高灵敏度和极高的数据采集速率进行全光谱采集。这对于通过将水样一次大体积直接进样来获取有关分子离子、同位素模式和碎片离子的信息而言至关重要。对于《欧盟水框架指令》、《欧盟饮用水指令》或 EPA《清洁

水法案》中规定的大多数适用于 LC/MS 的化合物，采用此类 Q-TOF LC/MS 方法能够获得低至 ng/L 范围的方法检测限 [8]。

在环境应用中将三种不同的物质鉴定方法与精确质量数 LC/MS 结合使用：靶向筛查、疑似污染物筛查和非靶向筛查。

在靶向筛查中，参比标样与未知样品采用相同的分析方法进行测量并处于相同的工作列表中，从而可直接比较保留时间、精确质量数和碎片离子信息并获得（半）定量分析结果。

疑似污染物筛查是指利用预期污染物的化合物数据库和 MS/MS 谱库信息筛查疑似物质的工作流程。尽管没有可用的参比标样，但是通过比较精确质量数和同位素模式、保留时间和共流出碎片离子或者通过 MS/MS 谱库对比，化合物鉴定结果的可信度越来越高。

非靶向筛查旨在鉴定无法获知结构信息的样品中所检测到的所有剩余组分。通常，非靶向筛查包括对两个或多个样品或样品组进行统计对比以进行数据简化。全面鉴定考虑到精确质量数、同位素模式和 MS/MS 谱图信息，包括用于已知化合物的谱库对比以及针对未知物的谱图相似性和模拟碎裂工具，如 Agilent MassHunter 分子结构关联 (MSC) 软件。

已证实，包含所有预期污染物和理论预测污染物及其转化产物的精确质量数 MS/MS 谱图数据的化合物数据库有助于在所有三种筛查工作流程中鉴定潜在相关的化合物并支持高效的数据分析。Agilent MassHunter 水质筛查个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 包含 1400 多种环境污染物的相关列表，其中包括农药、药物、个人护理用品、大量工业化学品及其转化产物。该 PCDL 包括当前美国、欧盟和中国监管的所有化合物，以及之前已在环境中检出或因其产量或广泛使用而可能检出的其他化合物。

可搜索的字段包括化合物类别和法规标签等化合物信息，便于在靶向和疑似污染物筛查中创建水质筛查 PCDL 的子集。水质筛查 PCDL 包含 1000 多种化合物及其精确质量数 MS/MS 谱图，可直接支持针对靶向和疑似污染物筛查的安捷伦全离子 MS/MS 工作流程，并且大大提高了潜在污染物鉴定的可靠性 [9]。

本应用简报介绍了将 Agilent 1290 Infinity UHPLC 与 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统结合使用，对污水处理厂出水中的污染物进行筛查和（半）定量分析。从三月到六月底，在三个半月内对位于瑞士农业区和农村地区的四家污水处理厂进行采样，时间贯穿了主要的农药施用期。对潜在水污染物的全面筛查揭示了不同处理和不同集水区的化学特性。利用包含约 390 种化合物的水质筛查 PCDL 的子集进行靶向筛查和（半）定量分析。在疑似污染物筛查中，利用整个全面的水质筛查 PCDL 高度可靠地查找和鉴定化合物。文中显示了所使用的两种不同的筛查策略的实例。在第一种方法中，Q-TOF 在全离子 MS/MS 模式下操作，采用三种碰撞能量。全离子技术能够轻松设置采集方法，采用 MS/MS 谱库验证潜在污染物，从而使母离子和子离子在色谱中实现共流出。另一种方法用于无法获取谱库谱图或由于共流出得分低而无法验证的化合物。在自动 MS/MS 方法中，使用第二次进样将母离子质量数添加至目标物列表中。将获得的谱图与 MS/MS 谱库进行对比，从而实现化合物鉴定。该工作流程还可与 TOF 模式下操作的发现运行相结合，从而获得疑似物的目标列表。

实验部分

试剂与标准品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈、甲醇和乙酸购自 Fluka (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland)。乙酸铵购自 VWR International (Darmstadt, Germany)。超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。为采集精确质量数 MS/MS 谱图，各种参比化合物中的大多数化合物购自 Sigma-Aldrich (Buchs, Switzerland) 或 VWR International (Darmstadt, Germany)。转化产物和残留物的参比标样购自 Ehrenstorfer (LGC Standards, Wesel, Germany)。使用农药、药物和滥用药物的混合标准溶液对保留时间进行评估，该混合标准溶液是 LC/MS 农药全套测试混标（部件号 5190-0551）、LC/MS 法医毒理学全套测试混标（部件号 5190-0555）的组成部分，或由研究组提供。

标准储备溶液的配制方法为：根据物质的理化特性不同，将参比化合物溶解于异丙醇、乙腈、甲醇、水或其混合物中。在校准和加标实验中，将农药、药物和滥用药物的全套测试混标制成多分析物工作溶液。标准储备溶液以及多分析物工作溶液在使用之前储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。用自来水稀释工作溶液来配制校准样品。

样品前处理

在三个半月内（三月至六月），采集中欧四家不同污水处理厂的出水，得到 14 天的混合样品。三家污水处理厂的集水区主要为农业区（AG、AI、AL），而另一个集水区位于市区（AZ）。其中一家污水处理厂还接纳一部分工业废水（AL）。三家污水处理厂（AG、AL、AZ）采用高效的硝化-反硝化处理，因此预期能够更好地去除痕量污染物。

使用玻璃纤维过滤器对样品进行过滤，并储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下。在测量前一刻将样品解冻，并将一份样品转移至 HPLC 样品瓶中。

LC/Q-TOF MS 分析

采用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统进行分离，该系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
- 配备大体积进样工具包 (G4216-68711) 的 Agilent 1290 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)

该 UHPLC 系统与配备双电喷雾安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent G6550A iFunnel 四极杆飞行时间液质联用系统结合使用。Q-TOF 液质联用仪在下列条件下操作：

- 采用 Agilent MassHunter 采集软件 B.06.01 版，在两种不同方法中分别采用正离子或负离子电喷雾离子化模式 (ESI) 在 2 GHz 的扩展动态范围模式下运行
 - 全离子 MS/MS 采集，采用三次扫描/秒的采集速率和两种不同的碰撞能量
 - 自动 MS/MS 采集，在 MS 和 MS/MS 下均采用五次扫描/秒的数据采集速率

在全离子采集方法中使用两种碰撞能量得到包含母离子的低能量通道以及包含母离子和子离子的两个高能量通道的交替谱图。

使用在 1.0 mL/min 的流速下运行的 Agilent Infinity 1260 等度泵 (G1310B) 以及 1/100 分流器 (G1607-60000) 输送参比质量离子。进入参比雾化室的最终流速为 10 μ L/min。

表 1 列出了色谱条件，而表 2 列出了主要的质谱条件。

使用 MassHunter 定性分析软件 B.07.00 对数据进行评估。如果通过分子式查找数据挖掘算法在精确质量质谱数据中检出的化合物的质量误差小于 5 ppm 并且具有足够高的得分（包括同位素丰度和同位素质量间距），则水污染物的鉴定结果将报告为阳性。为峰检测指定 ± 1 min 的保留时间窗口以补偿由基质变异性引起的保留时间漂移。

表 1. 色谱条件

参数	值														
UHPLC 色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD SB-Aq, 2.1 \times 150 mm, 1.8 μ m (部件号 859700-914)														
柱温	40 $^{\circ}$ C														
流动相	A) 1 mM 乙酸铵 + 0.1% 乙酸 B) 0.1% 乙酸的乙腈溶液														
梯度程序	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>% B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2.0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>14.0</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>16.0</td> <td>98</td> </tr> <tr> <td>19.0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>19.5</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	% B	0.0	0	2.0	0	14.0	98	16.0	98	19.0	0	19.5	0
时间 (min)	% B														
0.0	0														
2.0	0														
14.0	98														
16.0	98														
19.0	0														
19.5	0														
停止时间	20.0 min														
后运行时间	3.0 min														
流速	0.40 mL/min														
进样量	100 μ L														

表 2. 主要 MS 条件

参数	值
载气温度	160 $^{\circ}$ C
载气流速	16 L/min
雾化器压力	30 psig
鞘气温度	350 $^{\circ}$ C
鞘气流速	12 L/min
	正离子 负离子
毛细管电压	4500 V 3500 V
喷嘴电压	500 V 1000 V
参比质量校正	121.05087 112.98559 922.00980 1033.98811
全离子 MS/MS	
质量范围	50-1200 amu
扫描速率	3 幅谱图/秒
碰撞能量	0–20–40 V
自动 MS/MS	
MS 质量范围	100-1200 amu
MS/MS 质量范围	50-1200 amu
扫描速率	5 幅谱图/秒 (MS) 5 幅谱图/秒 (MS/MS)
碰撞能量	20 V

Agilent MassHunter 水质筛查 PCDL 的创建

在碰撞能量为 10、20 和 40 V 的靶向 MS/MS 模式下，利用流动注射或使用短色谱柱采集单个分析物溶液的精确质量谱图。如果母离子稳定性需要更高的碰撞能量，则在第二次运行中采集额外的谱图。通常，采集每种分析物的 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 离子形态的 MS/MS 谱图。如果观察到丰度较高的其他加合离子形态，则还采集 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 或 $[M+Cl]^-$ 形态的精确质量 MS/MS 谱图。在正离子化或负离子化模式下，可采集到 1000 多种相关水污染物的有意义的 MS/MS 谱图。对于许多化合物，在两种离子化模式下采集得到了一种以上母离子形态的 MS/MS 谱库谱图。为消除质量分配误差，将所采集谱图中的碎片离子质量与理论碎片分子式进行比较，并根据其理论质量数对所有离子峰进行校正。所有

MS/MS 谱图均经过谱图噪音修正，并采用最低基峰阈值以确保所有碎片离子均获得良好的离子统计数据。经校正的谱图包含在安捷伦水质筛查个人化合物数据库与谱库 (G6882CA) 中。

然后利用该水质筛查 PCDL 筛查和鉴定四家污水处理厂出水中的环境污染物。此外，通过给定的 UHPLC 方法分析农药、药物和滥用药物的混合标准溶液，将保留时间信息添加至 390 种化合物中，从而将保留时间添加至鉴定得分中并提高鉴定的可靠性。

图 1 显示了 MassHunter PCDL Manager 软件的屏幕截图，以及在负离子化模式下采用 20 V 的碰撞能量采集得到的抗病毒药物阿昔洛韦的精确质量 MS/MS 谱图。

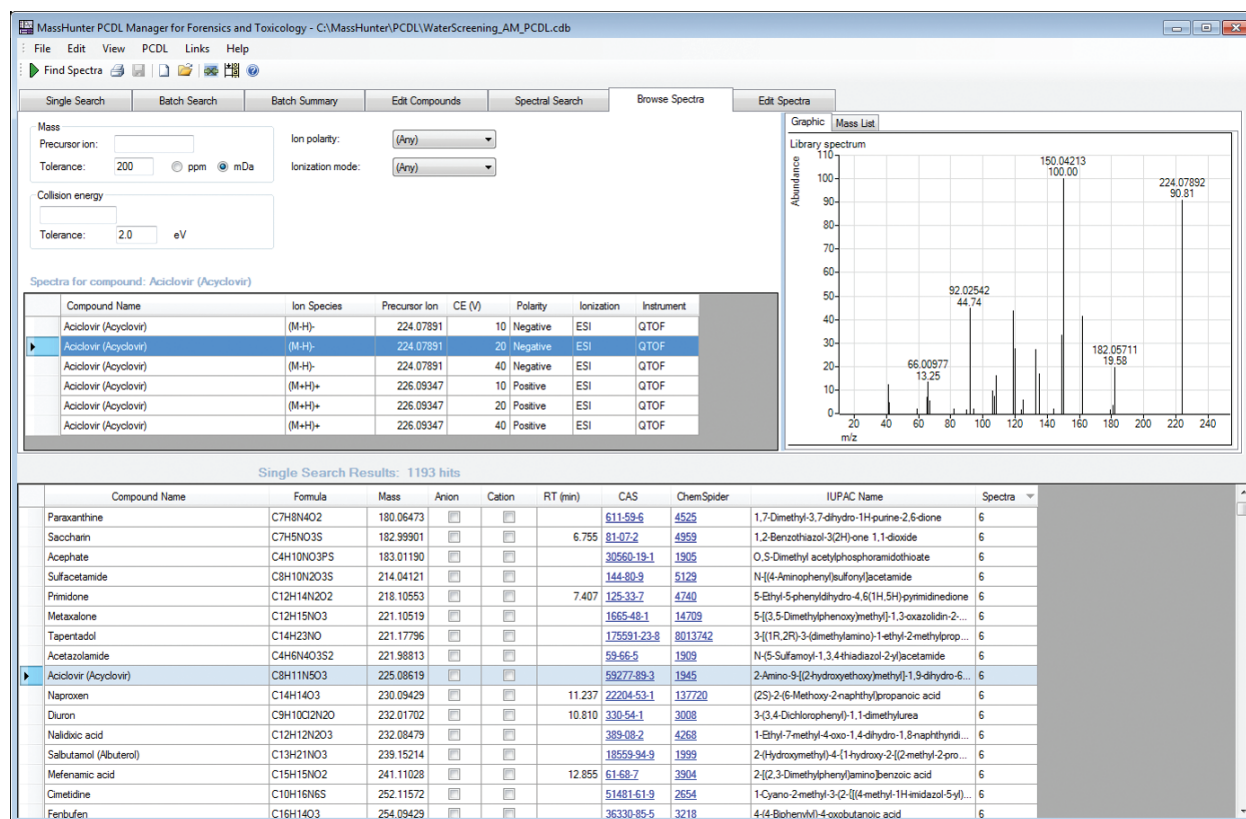


图 1. Agilent MassHunter PCDL Manager 软件，其中显示了 Agilent MassHunter 水质筛查 PCDL 以及在负离子化模式下采用 20 V 碰撞能量采集的阿昔洛韦的精确质量数 MS/MS 谱图

结果与讨论

农药、药物和个人护理用品的靶向筛查

在对污水处理厂出水中的农药、药物和个人护理用品进行靶向筛查和（半）定量分析时，在碰撞能量为 0、20 和 40 V 的正离子和负离子全离子 MS/MS 模式下对样品进行测量。包含 390 个条目的 PCDL 子集由水质筛查 PCDL 创建得到，其中包括可获得参比标样的所有化合物。首先在 MassHunter 定性分析软件 (B.07.00) 中使用分子式查找数据挖掘算法对校准样品的数据进行评估，质量误差为 ± 5 ppm，与预期保留时间相比，保留时间窗口为 ± 0.5 min。在正离子化模式下，将 $[M+H]^+$ 和 $[M+NH_4]^+$ 形态视为电荷载体，在负离子化模式下，则将 $[M-H]^-$ 形态视为电荷载体，因为它们可由 PCDL 中包括的大多数精确质量 MS/MS 谱图表示。使用水质筛查 PCDL 作为碎片离子源并评估 MS/MS 质谱库中的五种特异性最强的离子，通过碎片离子确证完成鉴定。在全离子 MS/MS

软件工作流程中，鉴定出与分子离子完美共流出的碎片离子，并检测出理想的碰撞能量和相对比率。该信息传输到 MassHunter 定量分析软件进行（半）定量分析和批次查看，使用分子离子和碎片离子的精确质量数以及同位素模式匹配实现高度可靠的化合物鉴定。

在 390 种目标化合物中，在正离子化模式下检出 315 种化合物，在负离子化模式下检出 75 种化合物。通过直接将 100 μ L 水进样至 UHPLC Q-TOF MS 系统，加标自来水样品中 60% 以上的化合物可以在 10 ng/L 或更低的浓度下定量。另外 35% 的化合物在 10-100 ng/L 的浓度范围内被检出，而仅有 5% 的化合物在 200 ng/L 或更高的浓度下被检出。对于大多数目标化合物，可使用一种或多种特定的碎片离子作为定性离子，并且分子离子和碎片离子的质量准确度通常优于 5 ppm。图 2 显示了重点污染物 (EU) 列表和 US EPA 方法 1694 中一些实例的提取离子色谱图、质谱峰谱图和校准曲线。

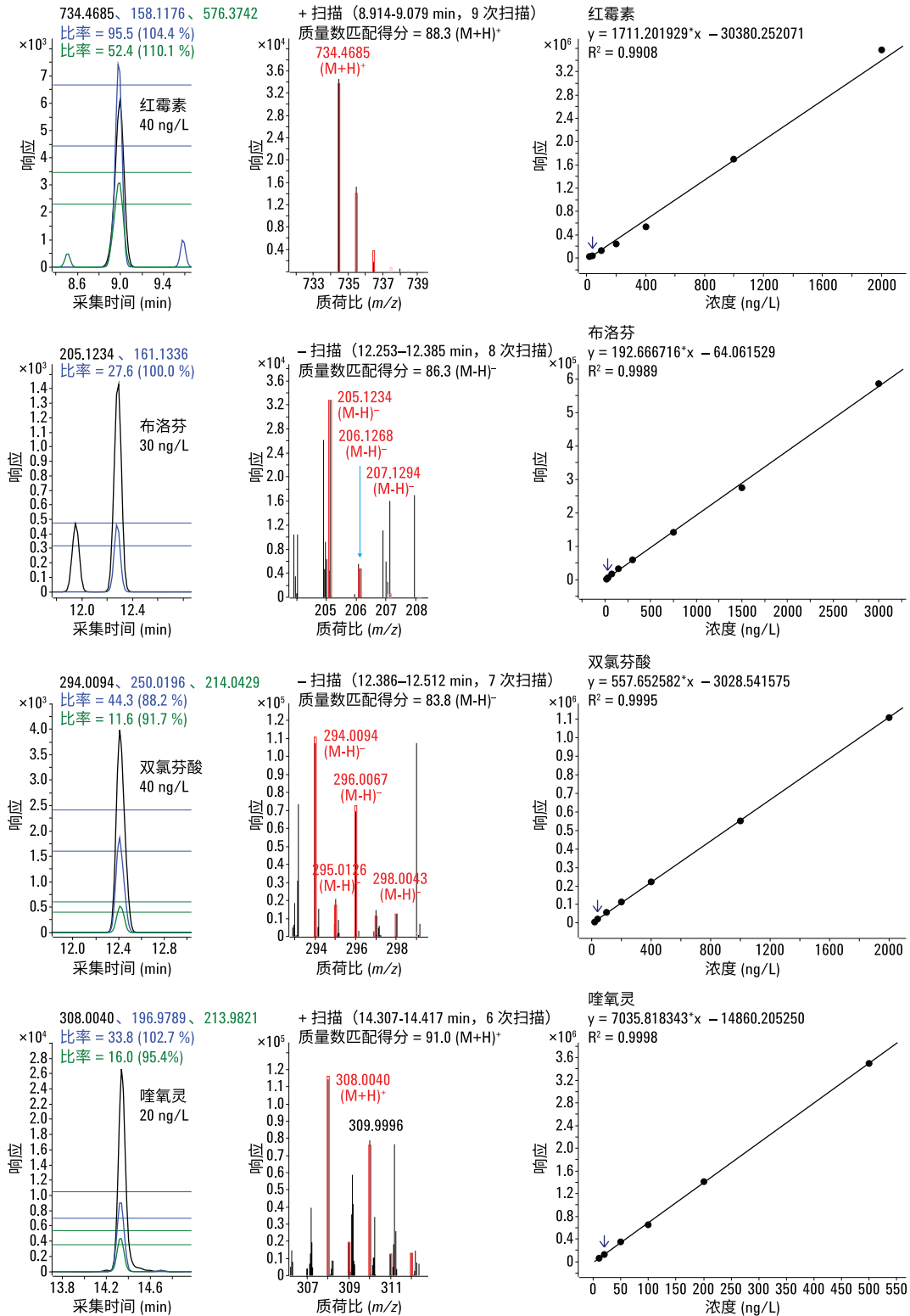


图 2. 红霉素 (正离子化模式)、布洛芬 (负离子化模式)、双氯芬酸 (负离子化模式) 和喹氧灵 (正离子化模式) 的分子离子和碎片离子的 EIC 色谱图、质谱峰谱图以及校准曲线

针对污水处理厂出水中的样品使用此靶向筛查方法能够对几 ng/L 至若干 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内的各种环境污染物进行（半）定量分析。所发现药物残留物主要存在于大型污水处理厂（AG、AL、AZ）的出水中，这些污水处理厂均接纳约 50000 人口当量的废水，而 AI 接纳了约 7100 人口当量的废水。在所有污水处理厂出水中，鉴定出 X 射线造影剂的估计浓度为：碘美普尔浓度高达 $7\ \mu\text{g/L}$ ，碘普罗胺浓度高达 $2\ \mu\text{g/L}$ 。其他常见药物包括氨磺必利（高达 $500\ \text{ng/L}$ ）、阿替洛尔（高达 $1.7\ \mu\text{g/L}$ ）、美托洛尔（高达 $470\ \text{ng/L}$ ）和曲马多（高达 $2\ \mu\text{g/L}$ ）以及卡马西平、双氯芬酸、布洛芬、萘普生和磺胺甲恶唑。对卡马西平、磺胺甲恶唑和安乃近的代谢物进行了鉴定。在污水处理厂出水中共鉴定出 33 种药物及其代谢物。正如预料的，在 AZ 出水中发现的上述化合物的数量最多，该污水厂存在城市集水区。然而，AI 出水中的浓度最高，可能是由于该污水厂采用的简单处理方法的污染物去除效率有限。

在所有污水处理厂出水中，共检出 46 种农药。在所有污水处理厂中均检出浓度为 $14\text{-}770\ \text{ng/L}$ 的杀虫剂避蚊胺 (DEET)。另外所有污水处理厂样品中还存在除草剂异丙草胺（高达 $1.1\ \mu\text{g/L}$ ）和异丙隆（高达 $450\ \text{ng/L}$ ）。在 AI 出水中发现的农药的数量最多，该污水厂的集水区主要为农业集水区。其中生长的主要作物包括谷物、蔬菜、玉米、甜菜和土豆。在该污水处理厂的出水中最常发现且浓度最高的农药包括啉菌酯、氟噻草胺、利谷隆、苯嗪草酮、灭多威、嗪草酮、霜霉威、螺环菌胺和特丁津。所有这些农药主要用于上文所列的作物。

图 3 显示了污水处理厂 AI 出水样品中的抗癫痫药物卡马西平和农药啉菌酯的归一化色谱图，其中涵盖了从三月到六月底所采集的样品。尽管药物浓度在整个采样期间基本恒定，但是农药浓度随生长期而增加。此实例表明与在特定时间段进入水循环的化合物相比，连续引入的化合物具有不同的污染物图谱。

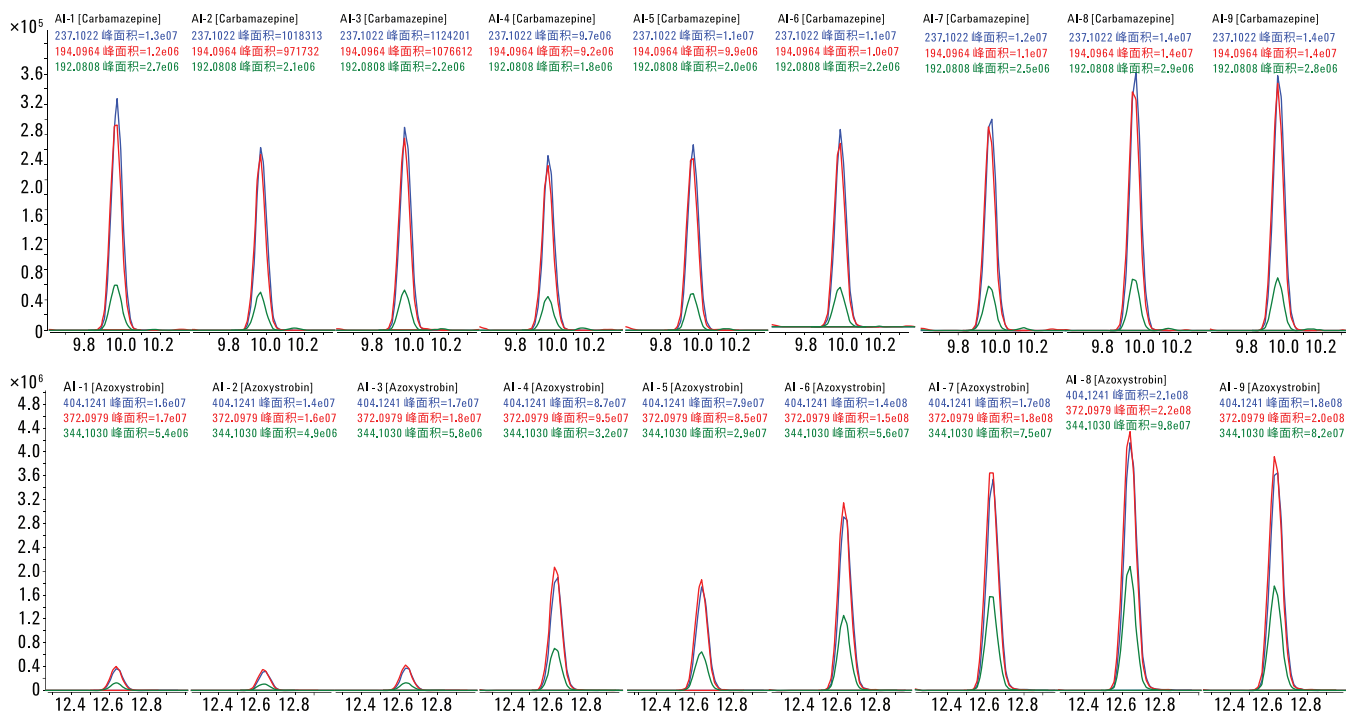


图 3. 采样期间（三月到六月底）得到的抗癫痫药物卡马西平和农药啉菌酯的分子离子和碎片离子的归一化 EIC 色谱图

使用全面的 Agilent MassHunter 水质筛查 PCDL 进行广泛的疑似污染物筛查

基于靶向筛查的结果，选择污水处理厂 AI 和 AZ 的样品进行广泛的疑似污染物筛查，寻找包括在水质筛查 PCDL 中所有的剩余化合物。精确质量数 MS/MS 信息的可获得性对于鉴定潜在的候选物至关重要，可在全离子 MS/MS 工作流程中用于提取和校准分子离子和特征碎片离子的 EIC，或用于将采集的精确质量数 MS/MS 谱图与 PCDL 中的参比谱图进行谱库匹配。图 4 显示了在鉴定污水处理厂出水中的一些污染物实例时所使用的两种工作流程。

全离子 MS/MS 筛查工作流程

在全离子 MS/MS 工作流程中，无需低能量通道中的碎裂即可采集到精确质量数据。几乎同时使用两个高能量通道，在非常快速的序列步骤中采用两种不同的碰撞能量将化合物碎裂，无需进行母离子选择，且两个通道下的精确质量碎片数据均被记录。采用分子式查找算法分析数据时，水质筛查 PCDL 提供了母离子分子式信息，并提取所有指定的离子形态的化合物色谱图。在推断的鉴定中，对于 PCDL 中储存的 MS/MS 谱图中指定数量的丰度最高的碎片离子，其色谱图从高能通道中自动提取。例如，图 4A 显示了水质筛查 PCDL 中缬沙坦的精确质量谱库谱图，并与污水处理厂 AI 出水样品中高能干净谱图（图 4B）进行了比较。红色三角形指示出从谱库谱图中选择的碎片离子，以便进行评估。

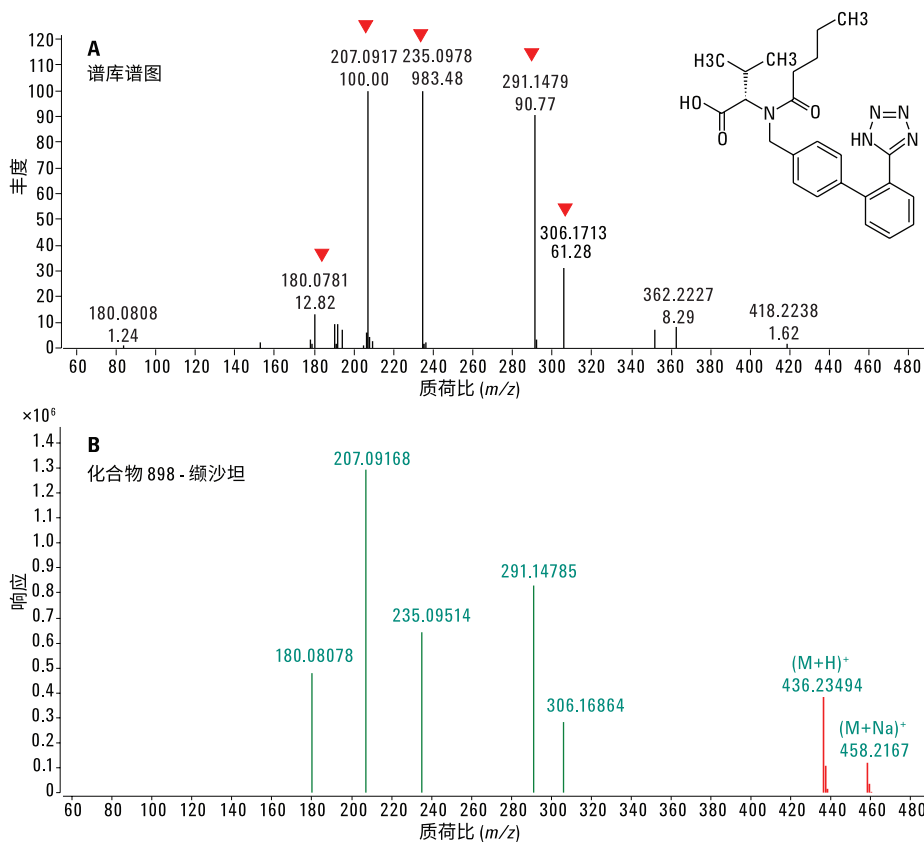


图 4. 在 20 V 碰撞能量下得到的缬沙坦的精确质量谱库谱图 (A) 与污水处理厂 AI 的出水样品中采集的高能谱图 (干净谱图) (B) 的对比。谱库谱图 (A) 中的红色三角形表示自动选择用于全离子 MS/MS 评估的离子

尽管谱库谱图基于 20 V 的碰撞能量，但高能量干净谱图中结合了 20 V 和 40 V 下两个高能通道采集到的信息。

通过叠加母离子和碎片离子的色谱图并计算共流出得分对血管紧张素受体阻滞剂 (ARB) 缬沙坦的鉴定结果进行确证。共流出得分需要考虑丰度、峰形 (对称性)、峰宽和保留时间等因素。对归一化强度比率进行绘图，以使用户在共流出曲线中进行检查。图 5A 显示了高能通道下得到的分子离子色谱图与碎片离子色谱图的叠加图。所有五个碎片离子色谱图均表明与母离子共流出。

这一现象还体现在图 5B 的共流出曲线中。详细的化合物鉴定结果 (包括共流出得分) 如图 5C 的化合物表格所示。

当分子离子的 EIC 和至少一个或两个碎片离子表现出完美的共流出时，可实现高度可靠的鉴定，具体体现为共流出得分 > 90 (满分 100)，并且分子离子和碎片离子的峰谱图的质量准确度优于 5 ppm。根据这一规则，在污水处理厂 AI 的出水中鉴定出其他药物，即血管紧张素受体阻滞剂坎地沙坦、厄贝沙坦和氯沙坦。

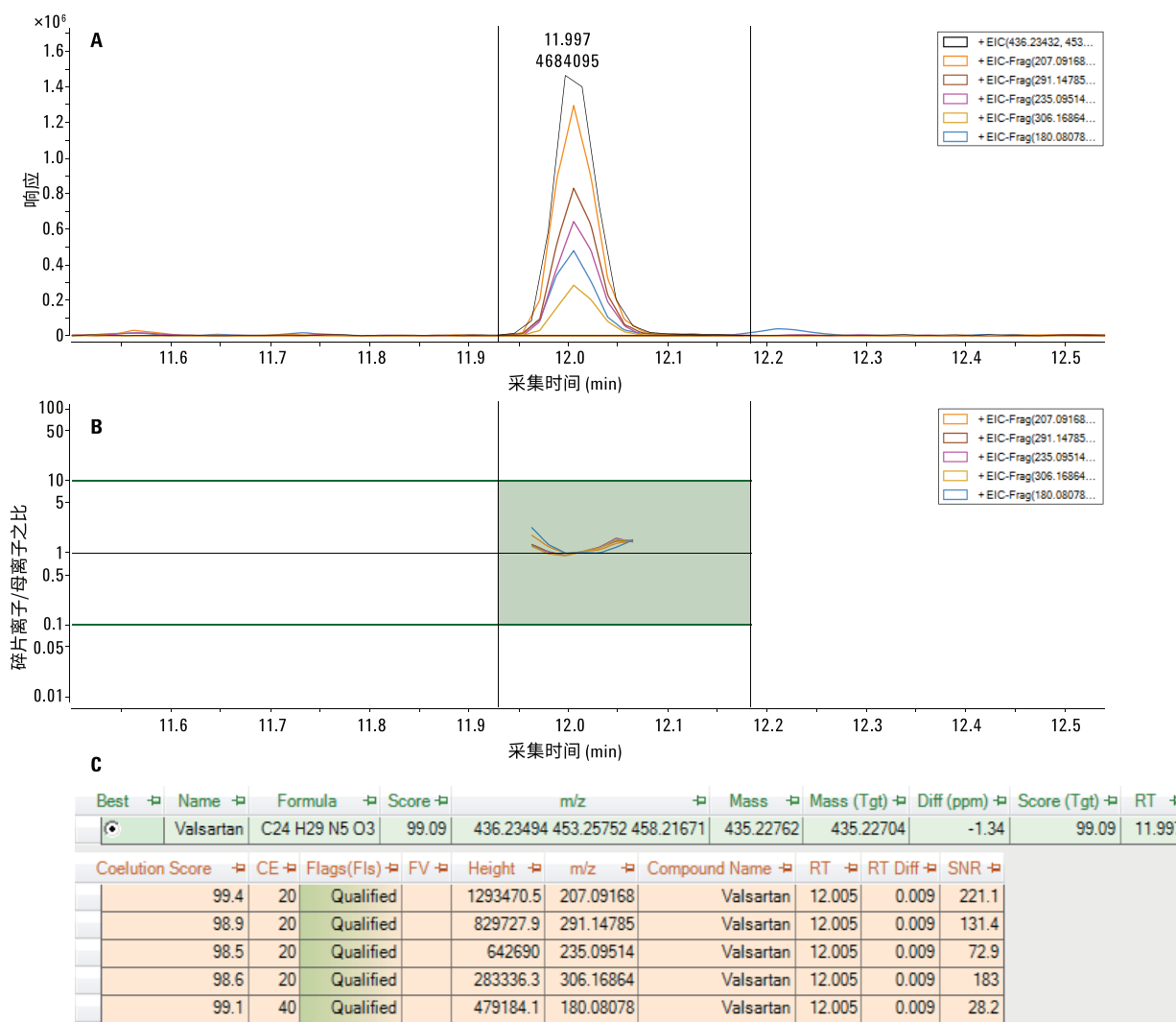


图 5. 污水处理厂 AI 的出水样品中缬沙坦的母离子和碎片离子的叠加谱图 (A)、共流出曲线 (B) 以及包括共流出得分的化合物鉴定结果 (C)

还鉴定出在之前工作流程中（使用参比标样的靶向筛查）未检出的其他药物和个人护理用品，包括甲红霉素、非索非那定、西他列汀、塞利洛尔和苯基苯并咪唑磺酸等化合物。此外，还检出九种其他农药（敌草胺、嘧霉胺、咪唑菌酮、环草定、二甲吩草胺、啶酰菌胺、地乐酚、咯菌腈和戊菌唑）以及全氟辛酸 (PFOA) 和几种有机磷酸酯（磷酸三乙酯、磷酸三(2-氯乙基)酯、磷酸三丁酯和磷酸三苯酯）。在 AZ 样品中，检出了缬沙坦、坎地沙坦、厄贝沙坦以及非索非那定、甲红霉素、文拉法辛及其代谢物去甲基文拉法辛、西酞普兰、西替利嗪、氯吡格雷和利托那韦。除 PFOA 以外，还检出全氟壬酸。在污水处理厂 AZ 的出水中未检出和确认出更多农药。

使用靶向 MS/MS 进行疑似污染物筛查和验证

通过将精确质量数 MS/MS 谱图与精确质量数 MS/MS 谱库进行匹配来验证化合物，有时比全离子 MS/MS 工作流程更具优势。这种情况适用于以下情形：如果污染物仅以痕量浓度存在，从而碎片离子的信号强度较低，或者如果在低质量数碎片离子和基质离子之间发生干扰。此外，在母离子分离后进行精确质量数 MS/MS 谱库对

比被视为化合物验证的金标。在没有谱库可用的情况下，例如，对于最新鉴定出的化合物或疑似转化产物而言，可以在 MassHunter 分子结构关联 (MSC) 软件上对精确质量数 MS/MS 谱图与化合物的理论碎裂进行比较。

通常，该工作流程从全离子 MS/MS 采集发现运行开始，使用分子式查找数据挖掘算法与碎片离子确认对疑似化合物进行初步鉴定。在无法鉴定出碎片离子或者仅检出一个非特定碎片离子的情况下，从 MassHunter 定性分析软件中选择化合物并将其导入目标物列表中。在使用相同色谱分析的连续运行中，采集目标母离子的精确质量数 MS/MS 谱图。如果需要极高的灵敏度，则对于发现运行，在 TOF 模式下操作 Q-TOF 可能是有利的。使用 TOF 模式可获得更多数量的疑似污染物，从而在连续靶向 MS/MS 或自动 MS/MS 运行中获得更多的母离子质量数。然而，在此情况下，将检出更多的低丰度污染物。靶向 MS/MS 和自动 MS/MS 运行的数据分析从使用 MS/MS（靶向或自动）特征查找算法进行数据挖掘开始，然后使用 MassHunter 水质筛查 PCDL 进行谱库搜索。

图 6 显示了在污水处理厂 AZ 出水中发现的降糖药二甲双胍的化合物色谱图和 MS1 级峰谱图。由于该化合物的分子离子的质量数低，且特定碎片离子的质量数更低，因此在全离子 MS/MS 工作流程中无法验证该化合物，但是利用靶向 MS/MS 方法能够实现可靠的鉴定。二甲双胍的主要离子形态为 $[M+H]^+$ ，并且测得的 m/z 与计算得到的质量数具有很好的一致性 (-0.7 ppm)。质量信号周围的红色框显示预期的同位素比。测得的单一同位素质量信号和 $[M+1]$ 同位素信号的强度与理论模式具有非常好的一致性。然而， $[M+2]$ 信号存在干扰，因此目标得分仅为 72.7（满分 100）。

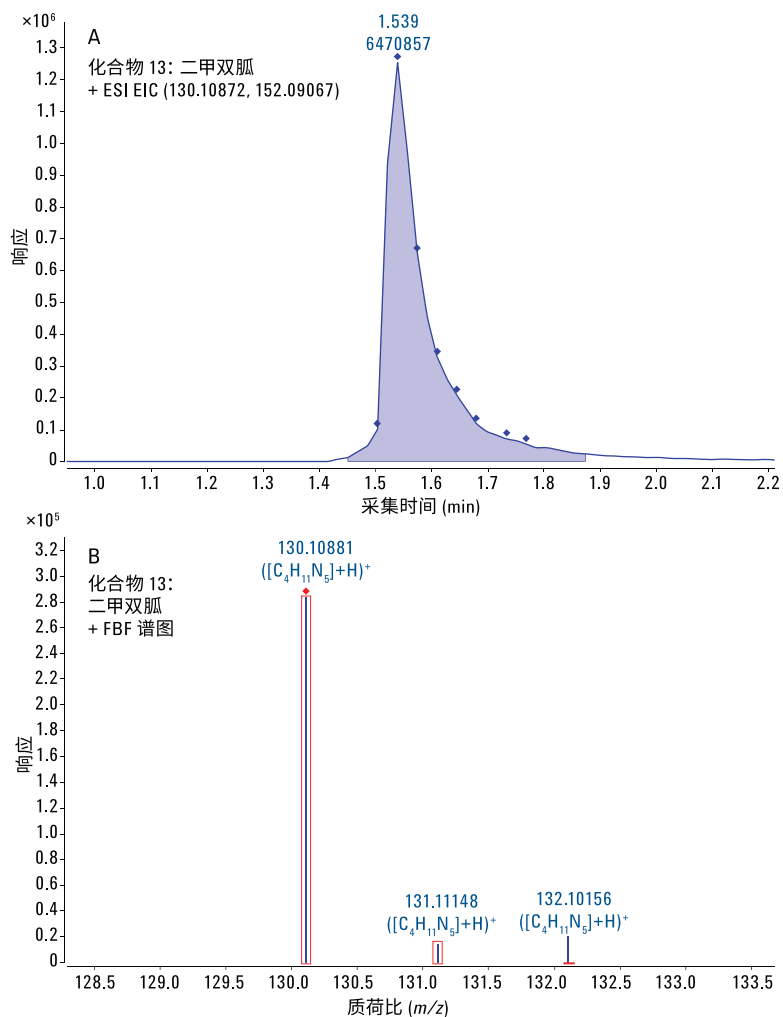


图 6. 通过分子式查找算法所获得的污水处理厂 AZ 出水中降糖药二甲双胍的化合物色谱图和干净的峰谱图

图 6 中的红色菱形指示出已采集到特定 m/z 所对应的 MS/MS 谱图。在峰范围内自动提取 MS/MS 谱图，并与 MassHunter 水质筛查 PCDL 中所包含的谱库谱图进行匹配。图 7 显示了在污水处理厂出水 (7A) 中采集的二甲双胍的 MS/MS 谱图与 PCDL 中谱库谱图 (7C) 的比较。不同谱图的镜像显示如图 7B 所示。二甲双胍的谱库谱图

中列出的所有主要碎片离子均在所测得的谱图中找到，且质量数提取窗口很窄，并且在 20 V 的碰撞能量下与参比谱图具有相似的比率。因此，对精确质量谱库进行反向搜索得到的得分为 95.4 (满分 100)，验证了在样品中存在二甲双胍。实现验证需要 MS/MS 得分高于 60。

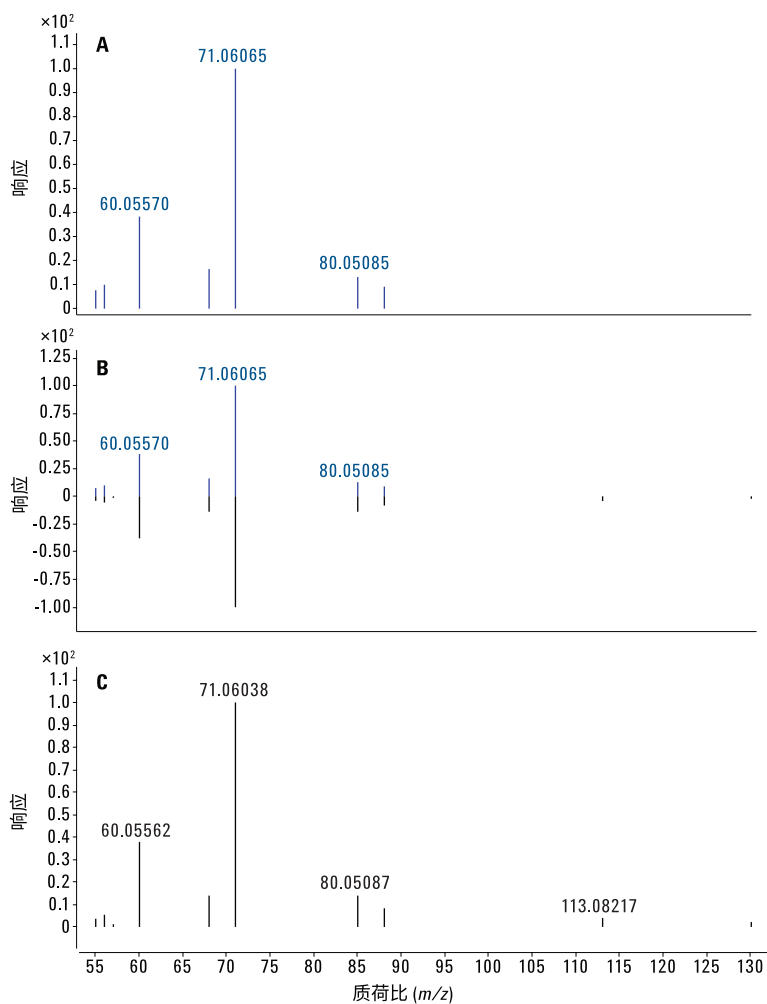


图 7. 在污水处理厂出水样品中测得的二甲双胍的谱图 (A) 与 Agilent MassHunter 水质筛查 PCDL 的参比谱图 (C) 以及差异谱图的镜像显示 (B) 的比较

图 8 显示了可使用靶向 MS/MS 工作流程进行验证的其他化合物示例。在 AZ 出水中检出三聚氰胺，其谱库得分为 85.3。其具有若干工业用途，是农药环丙氨嗪的代谢物。在 AI 出水中检出苯甲地那铵，其谱库得分为 91.5。这是已知最苦的化合物，在个人护理用品中用作苦味剂以免意外摄入。

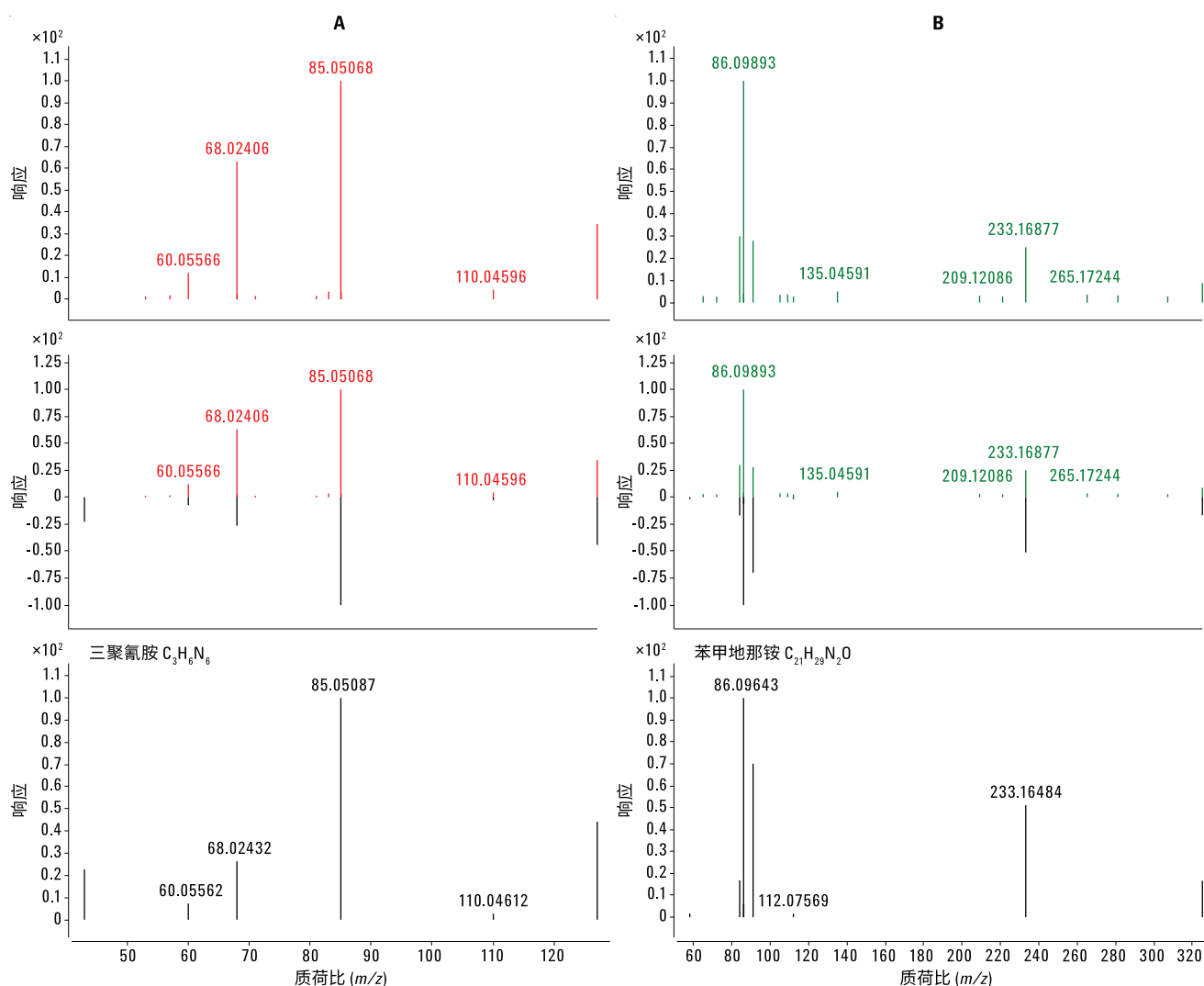


图 8. 利用 Agilent MassHunter 水质筛查 PCDL 的参比 MS/MS 谱图测得的污水处理厂出水样品 AZ 中三聚氰胺的谱图 (A) 和出水样品 AI 中苯甲地那铵的谱图 (B) 的对比

结论

开发出一种筛查和（半）定量分析水样中的环境污染物的方法，并将其应用于污水处理厂出水分析中。该方法充分利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统的低延迟体积及其能够在 UHPLC 分离中承受高反压的优势，从而提高了色谱分离度。该方法得益于 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 的高灵敏度以及安捷伦喷射流离子源的通用电离功能。

Agilent MassHunter 水质筛查 PCDL 是 Agilent MassHunter 定性和定量分析软件中靶向和疑似污染物筛查工作流程的完美补充。在靶向筛查和（半）定量分析中，PCDL 用于定义一组化合物并鉴定高选择性的定性离子。在疑似污染物筛查中，通过确认碎片离子或谱库搜索实现高度可靠的鉴定。利用这两种工作流程分析污水处理厂出水样品，通过痕量污染物不同的化学品清单揭示了处理技术以及集水区的特征。

采用目标物列表和单一碰撞能量的自动 MS/MS 采集与谱库匹配相结合，得到了与具有碎片离子共流出的安捷伦全离子 MS/MS 采集相近的验证率。然而结果发现，与全离子 MS/MS 工作流程相比，自动 MS/MS 采集得到的母离子分离对复杂基质和低质量数污染物的鉴定能力得到了提高。相反，全离子 MS/MS 采集速度极快，并能够区分邻近流出的异构体。全离子 MS/MS 工作流程的另一重要特征在于，能够在稍后时间内对测量过程中不在分析范围内的化合物进行重新解析，实现对新兴污染物的回顾性数据分析，而无需对旧样品重新采集数据。

参考文献

1. P. Gago-Ferrero, *et al.* Extended Suspect and Non-Target Strategies to Characterize Emerging Polar Organic Contaminants in Raw Wastewater with LC-HRMS/MS. *Environ. Sci. & Technol.* **49(20)**, 12333-12341 (2015)
2. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy
3. US EPA Method 1694 (2007) Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf (accessed 14 December 2015)
4. US EPA Contaminant Candidate List (CCL) and Regulatory Determination: Draft CCL 4 Chemical Contaminants. <http://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4> (accessed 14 December 2015)
5. M. J. Gómez, *et al.* Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *J. of Chromatog. A* **1217(45)**, 7038-7054 (2010)
6. T. Letzel, *et al.* LC-MS screening techniques for wastewater analysis and analytical data handling strategies: Sartans and their transformation products as an example. *Chemosphere* **137**, 198-206 (2015)
7. C. Rodriguez, *et al.* Indirect Potable Reuse: A Sustainable Water Supply Alternative. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **6**, 1174-1209 (2009)
8. D-H. D. Yang, *et al.* Sensitive Screening of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Water Using an Agilent 6545 Q-TOF LC/MS System (使用 Agilent 6545 Q-TOF 液质联用系统对水中的药物和个人护理用品 (PPCP) 进行高灵敏度筛查)。安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5954EN (2015)
9. E. L. Schymanski, *et al.* Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **407(21)**, 6237-6255 (2015)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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，2016

2016年3月29日，中国出版

5991-6627CHCN



Agilent Technologies