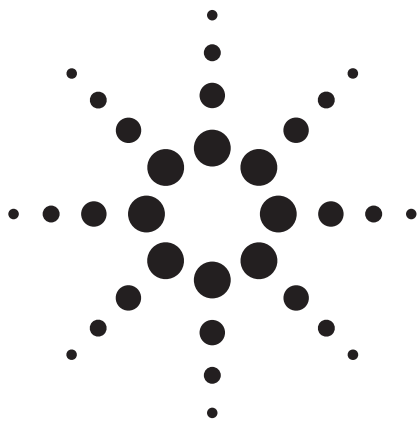


# 使用精确质量、同位素比和串联质谱对水中的个人护理用品进行分析



应用

环境

## 作者

Michael Zumwalt  
安捷伦科技有限公司  
9780 S Meridian Blvd.  
Englewood, CO 80112-5910  
美国

David Weil  
安捷伦科技有限公司  
10 N. Martingale Road, Suite 550  
Schaumburg, IL 60173-2292  
美国

Chin-Kai Meng  
安捷伦科技有限公司  
2850 Centerville Road  
Wilmington, DE 19808-1610  
美国

## 摘要

采用 Agilent 6510 四极杆飞行时间质谱 (QTOF) 分析地表水样品中存在的药物。采用快速分离高通量 Extend C18 色谱柱 (粒径 1.8  $\mu\text{m}$ ) 运行一个简单的梯度洗脱程序。在 54 种潜在的化合物中, 使用安捷伦分子特征提取算法 (MFE) 在一个样品中鉴定出多达 11 种化合物。另一种算法 (即 Mass Profiler) 也被应用于 MFE 数据处理过程, 用来对几个样品进行比较。由于 MFE 根据特征可能生成数千个潜在化合物, 所以

用 Mass Profiler 对两个不同样品的特征进行统计比较时, 能够判断出哪一个是独有的, 哪一个是共存的。所有工作都采用全扫描质谱数据进行。确定目标化合物时, 可借助精确质量全扫描串联质谱进行结构鉴定。

## 前言

在 20 世纪后三十年里, 化学污染的研究主要被限定为农药污染。随着 C. Daughton [1] 有影响力的文章的发表, 研究重心开始逐渐转移到药物和个人护理用品 (PPCP) 对环境的影响上。许多药物 (包括雌激素), 已被公认为内分泌干扰物, 或者干扰机体激素生理功能的化学药品。2004 年, 一份来自美国地质调查局 (USGS) 的报告 [2] 显示, 波托马克河中的小口黑鲈出现了很多的雌雄同体的现象 (雄鱼表现出雌鱼的特征)。

USGS 已经在波托马克河中发现了含有已知或推测为内分泌干扰化合物的农药、阻燃剂和个人护理用品。这些化合物之所以不断成为新出现的污染物被人们所熟知, 是因为它们不在当前的任何监控目标物名单中, 却仍在不断地被发现。因此, 运用足够强大的技术手段去鉴定这些化合物及其可能的代谢物是非常重要的。

在全扫描 (质量范围) 质谱 (MS) 中使用精确质量, 可得到用来鉴定的化合物的经验式。此外, 高度的质谱分辨率可以实现共流出化合物的选择性鉴定。同位素比也是有助于鉴定高碳数化合物, 以及包含氯和硫的化合物的有效工具。虽然这些工具的应用可以在很大程度上确证化合物的分子式, 但用户还是需要判断哪一个才是同分子量化合物可能的结构。

为了辅助结构鉴定的分析需要, 我们使用了四极杆飞行时间质谱 (QTOF) 的选择性串联质谱。因为安捷伦四极杆飞行时间



Agilent Technologies

质谱在串联质谱阶段仍可获得非常精确的质量，更容易确定离子的结构（即母离子的次级结构）。因此，与派生出的经验式有关的可能的结构数目就从多个降为一个。

需要从环境中寻找的药物监测名单总是在不断增加，其中有许多是结构未知的代谢物。鉴定这些化合物需要四极杆飞行时间质谱技术。此外，在 10-100 s 的相对较短的运行时间里鉴定样品中的这些化合物，快速扫描功能也是十分必要的。安捷伦四极杆飞行时间质谱能以每秒 20 张质谱图的速度采集全扫描质谱数据。这些海量的数据可能蕴含着数目众多的化合物，这就需要将它们转换为有用的信息。安捷伦分子特征提取（MFE）是 MassHunter 定性分析软件中的一个标准模块，它可运行以下步骤：

- 持续移除化学背景
- 消除共流出干扰
- 识别并归类同位素组

- 2D/3D 数据可视化
- 化学识别（精确质量、同位素匹配）
- 检索数据库（NIST、ChemIDPlus）

除了使用质量特征提取算法从色谱数据中抽取化合物特征外，另一个被称为 Mass Profiler 的算法也被用于不同样品的特征分析，来确定差异和共性。通过对每个样品进样分析三次，或者分析同一来源的多个样品，来确定采用 MFE 提取的样品特征在统计学上的一致性。各样品的称取结果称为一组。可对两组不同来源的样品进行比较，观察其特征差异是独有的还是具有共性的；若存在共性，可观察其丰度是否有差异。

采用固相萃取法对一批水样进行过滤和提取，能够使富集倍数增加约 1000 倍。本文分析的样品中包含 10-100 ppb 浓度水平的化合物，即其在原水样中相应的浓度范围为 10-100 ppt。这些可能存在于这些样品中的的化合物及其精确中性质量见表 1。

**表 1. 给定样品中可能存在的化合物名单及其中性质量**

化合物	中性质量	化合物	中性质量	化合物	中性质量
对乙酰氨基酚	151.06333	苯海拉明	255.16231	帕罗西汀	329.14272
沙丁胺醇	239.15214	度洛西汀	297.11873	雷尼替丁	314.14126
阿司匹林	180.04226	依那普利拉	348.16852	舍曲林	305.07380
安非他酮	239.10769	红霉素	573.51210	辛伐他汀	418.27192
咖啡因	194.08038	氟西汀	309.13405	磺胺氯吡嗪	284.01347
卡马西平	236.09496	氟伏沙明	318.15551	磺胺地索辛	310.07358
西咪替丁	252.11572	咪塞米	330.00772	磺胺二甲嘧啶	278.08375
氯贝酸	214.03967	吉非罗齐	250.15698	磺胺甲二唑	270.02452
西酞普兰	324.16379	氢氯噻嗪	296.96447	磺胺甲噁唑	253.05211
可待因	299.15215	酮洛芬	254.09429	噻苯达唑	201.03607
可替宁	176.09496	咪康唑	413.98602	三氯卡班	313.97805
脱氢硝苯地平	344.10084	萘普生	230.09429	三氯生	287.95116
双氯芬酸	295.01668	诺氟西汀	295.11840	甲氧苄啶	274.14298
地尔硫卓	414.16133	去甲舍曲林	293.05000	文拉法辛	267.12593
		1,7-二甲黄嘌呤	180.06473	华法林	308.10486

## 实验部分

### 样品制备

制备好的样品由位于科罗拉多州丹佛市的美国地质调查局国家水质实验室 (USGS/NWQL) 提供。样品制备过程的细节不包括在本应用中, 但可以根据需要提供。一般采用内含 0.5 g 聚合物吸附剂的一次性聚丙烯注射器式固相萃取小柱从地表水中提取药物。通过泵压使 1 L 样品通过固相萃取 (SPE) 小柱。随后分析物被 1 mL 甲醇洗脱, 浓度可被提高三个数量级。

### 液相质谱方法说明

#### 液相色谱条件

Agilent 1100 系列二元泵、脱气机、孔板进样器和柱温箱

色谱柱 Agilent ZORBAX RRHT Extend C18  
2.1 mm x 50 mm, 1.8  $\mu$ m  
安捷伦部件号: 727700-902

柱温 40  $^{\circ}$ C

流动相 A = 0.1% 甲酸水溶液  
B = 0.1% 甲酸乙腈溶液

流速 0.3 mL/min

进样体积 5  $\mu$ L

梯度程序

时间 (min)	%B	
0.0	0	
10.0	67	停止时间: 15 min
11.0	100	后运行时间: 10 min

#### 质谱条件

模式 正离子电喷雾离子化, 使用 Agilent G3251A  
Dual ESI 源

雾化器压力 40 psig

干燥气流速 9 L/min

干燥气温度 350  $^{\circ}$ C

毛细管电压 3500 V

扫描范围  $m/z$  50–1000

扫描速度 1 次扫描/s

#### 串联质谱条件

碰撞能量 30 V

扫描范围  $m/z$  50–1000

扫描速度 1 次扫描/s

## 结果与讨论

对所分析的几个样品中的样品 4 和 10 进行讨论。为了了解当前的工作, 我们在图 1 中展示了一张样品 4 首次进样的总离子流和基峰的重叠色谱图。基峰色谱图的生成有助于分析人员鉴别色谱图中的色谱峰所对应的实际化合物。图 2 为展示了这种峰顶端的质谱图。注意这张谱图的复杂性和困难性, 困难性主要是指我们不仅要判断哪个峰有价值 (因为它们可能属于共流出的化合物), 还不得不把这种情况推演到色谱图的其它一些峰上。

利用分子特征提取程序算法处理这些数据文件, 可以得到经过处理的色谱图, 其等值线图见图 3。上部左侧的色谱图是未经加工的 TIC, 与图 1 展示的相同。右侧是经过如上所述步骤处理的色谱图。随机背景噪音已经被去除。下列每张色谱图都有与之相对应的等值线图, 代表了  $m/z$  表示的质谱数据点和色谱保留时间点。左下角的等值线图展示了分布非常稠密的数据点, 其中大多数都是随机噪音。

右下角的等值线图是处理过的数据结果, 所以生成的大量分子特征可用于进行进一步仔细分析。实际上, 可采用下述设置进行数据过滤。该样品首次进样大约生成了 5431 个特征:

- 谱图的信噪比 > 2
- 质量范围:  $m/z$  150 - 800
- 考虑  $[M + Na]^+$  与  $[M + NH_4]^+$  加合离子
- 谱图相对强度 > 0.1%
- 每个特征必须包含至少 2 个离子

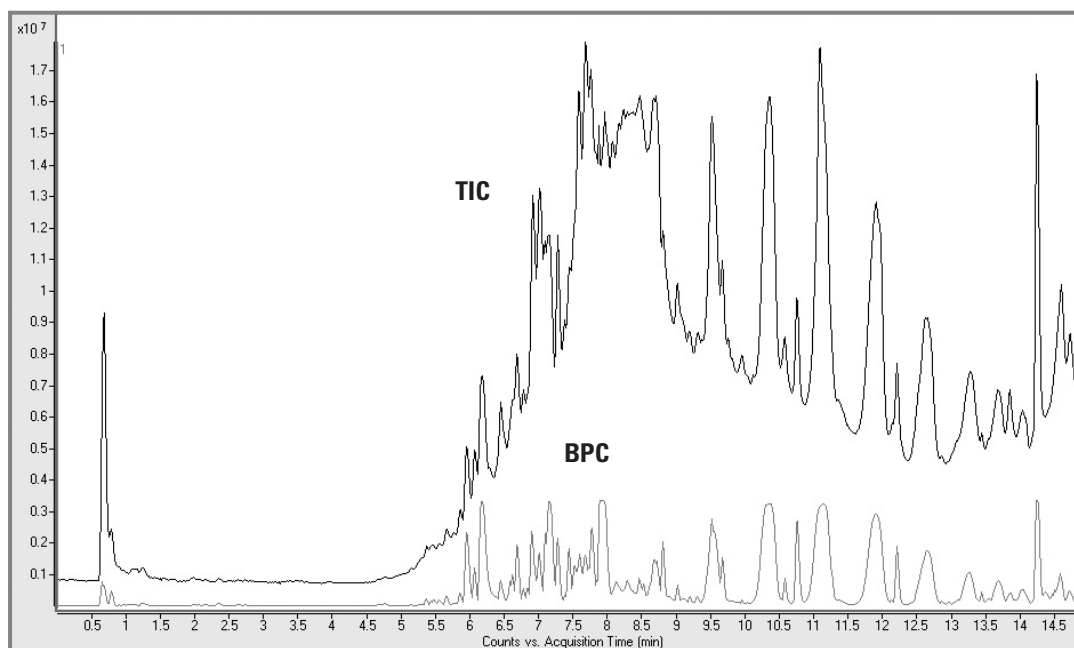


图 1. 样品 4 的总离子流色谱图 (TIC) 和基峰色谱图 (BPC) 的叠加图

假如我们现在需要考察已经发现的一些特征，我们可以从图 2 色谱峰顶点的谱图开始。保留时间为 6.445 min，在 6.448 min 时 MFE 生成的特征见图 4。图上部未处理的谱图与图 2 匹配。

然而，在图的底部显示了处理过的包含 12 个生成特征的谱图，去除了随机噪音并进行过滤。特征列表的一部分见图右侧所示。

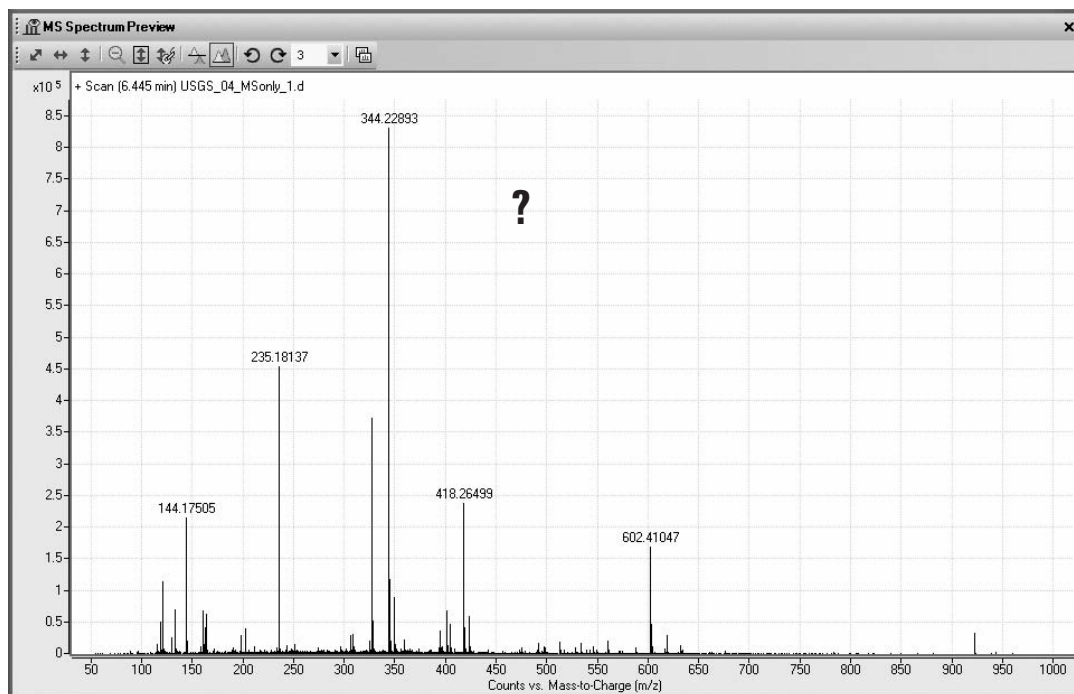


图 2. 保留时间为 6.445 min 时基峰顶点的质谱图

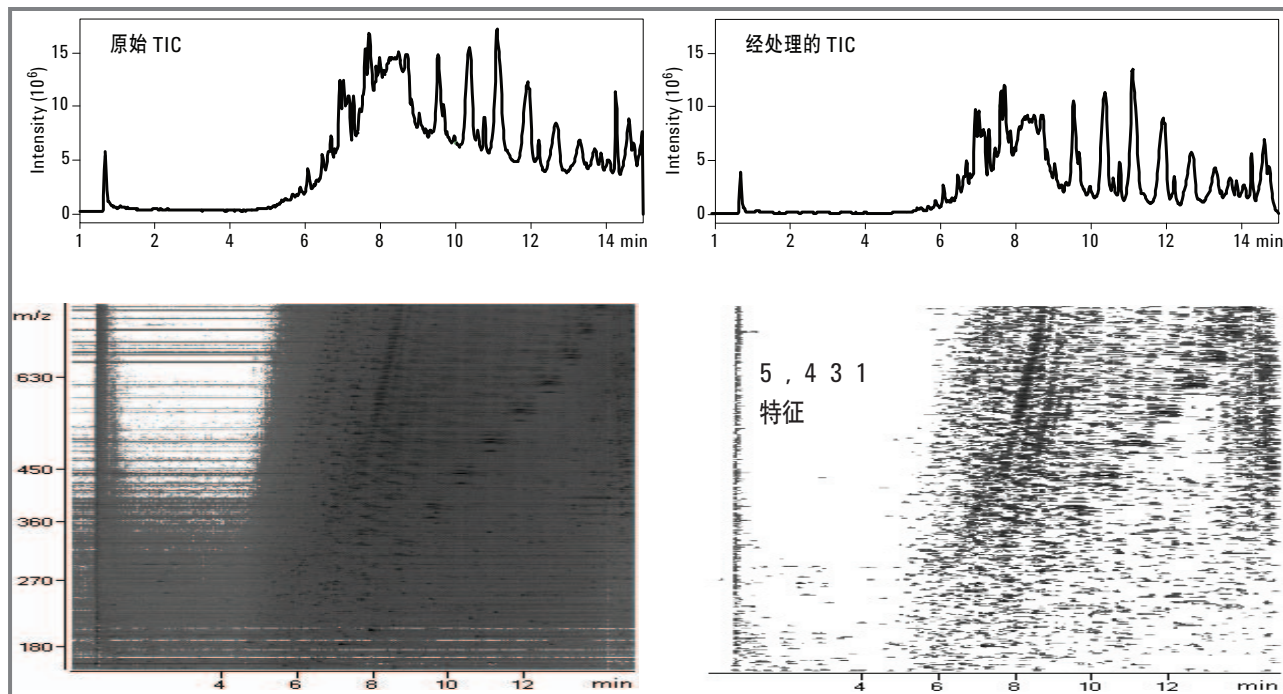


图 3. 样品 4 未经处理和经 MFE 处理的数据

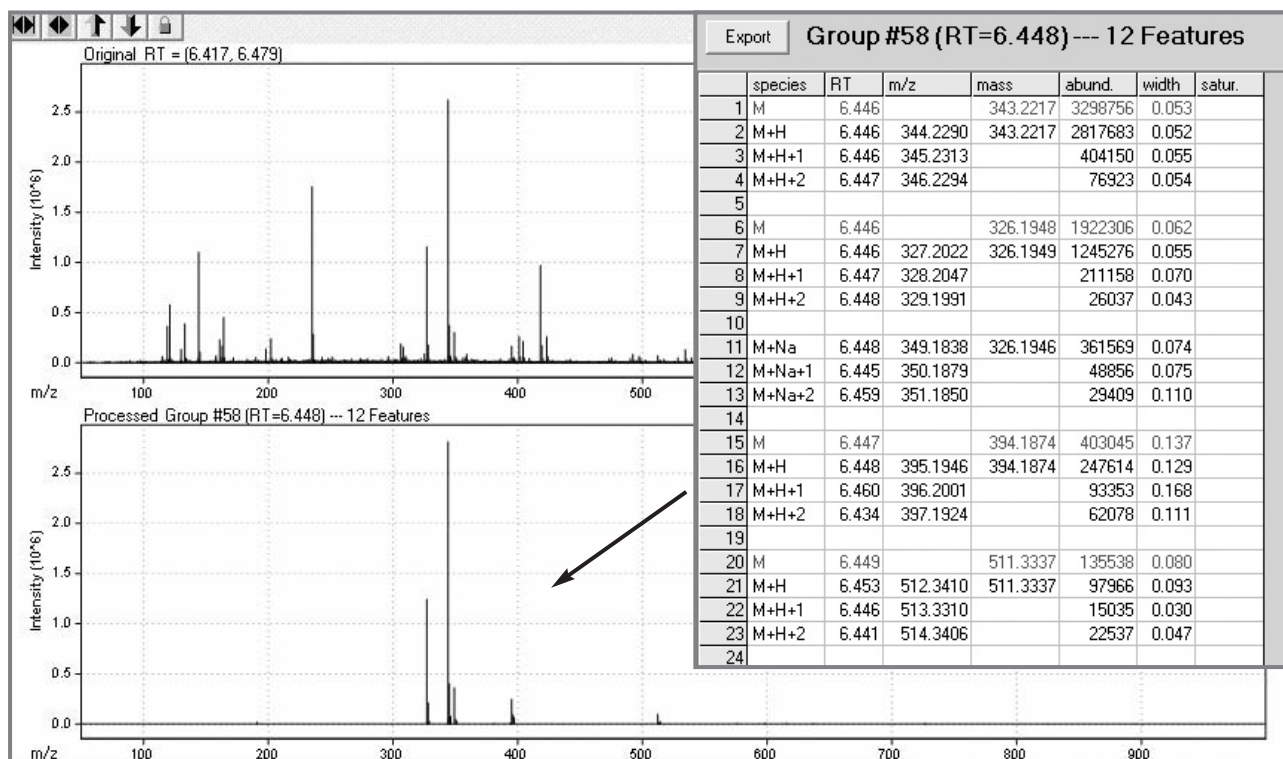


图 4. 生成的保留时间 6.448 min 时的 12 个特征

假如我们希望在过滤数据后只显示本文开头列出的化合物，我们可以将中性质量加入 MFE 列表，如图 5 所示。我们还假设目标化合物在 4 min 后才流出，且其质量范围为 150-600，与表 1 中所列化合物相对应。

图 5 所示化合物的数据被过滤以后，发现了样品 4 的 8 个特征，在图 6 中显示。包含这 8 个特征的色谱图也一并展示出来。

在更仔细地检查任一化合物之前，先将样品 4 的数据与另一个样品，即样品 10 的数据进行比较，采用 Mass Profiler 的算法来完成。为了使用 Mass Profiler，每个样品必须进

行三次进样，以确定出现频率高的特征，以及随机出现可被忽略的特征。本工作中每个样品均进样三次。数据先通过 MFE 处理生成特征。采用 Mass Profiler 过滤掉每个样品三次进样分析中不一致的特征。该数据结果称为一组。因此，在比较样品 4 和 10 的时候，Mass Profiler 将把它们作为组 4 和组 10。

在图 7 中，Mass Profiler 展示了组 4 和组 10 两者的共同特征（根据质量与保留时间所得）。通过点击显示的任一个特征点，我们可以看到两组共有的特征，以及生成中性质量的可能经验式。

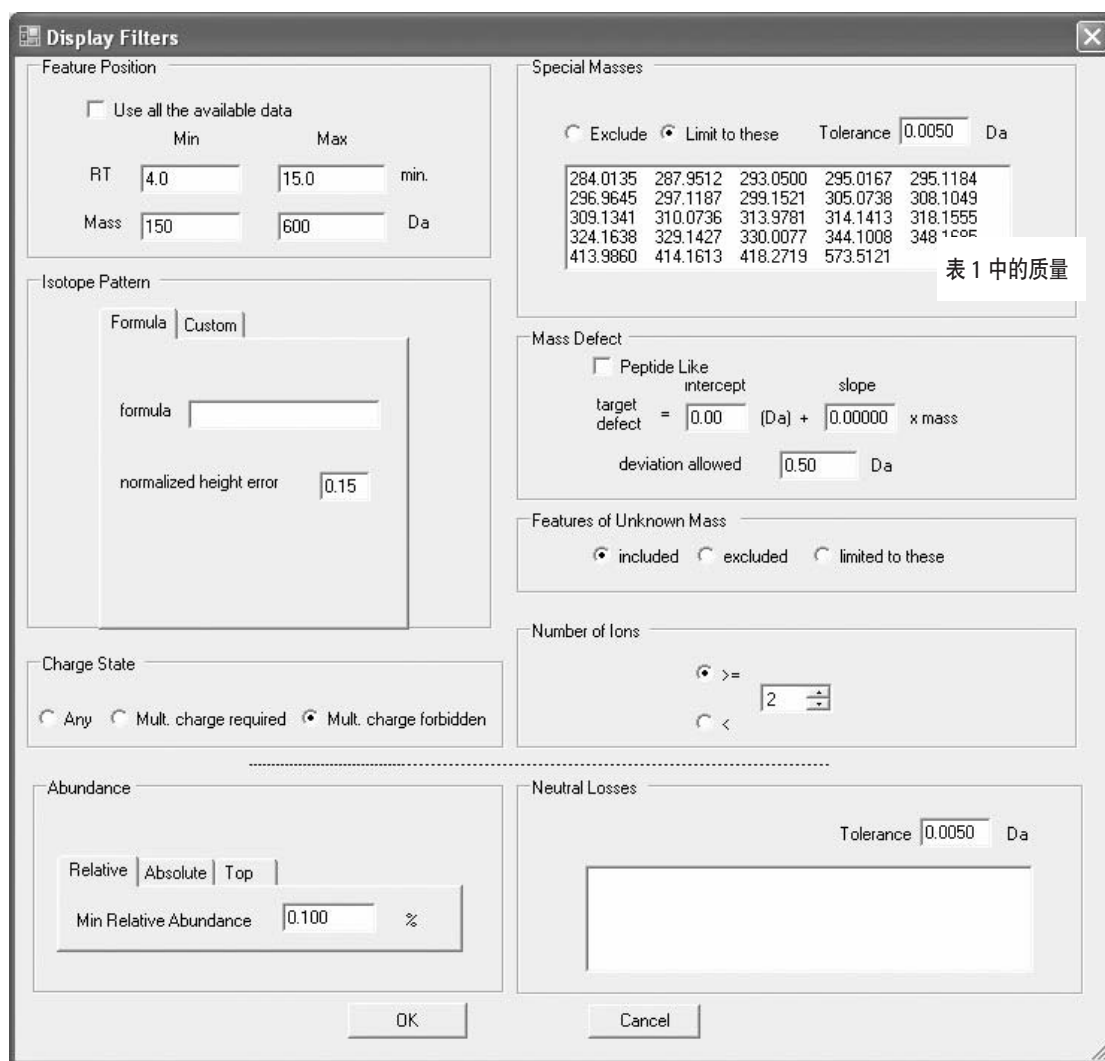


图 5. 显示寻找与表 1 所列化合物匹配特征的过滤设置

Export		features:8 / groups:8											
	Group	RT	mass	mass SD	abund.	satur.	height	#ions	minZ	maxZ	#z	width	#features
1	1	9.629	236.0961		915731		267469	2	1	1	1	0.045	1
2	2	5.678	299.1536		431858		91085	2	1	1	1	0.083	1
3	3	8.095	236.0961		382835		96590	2	1	1	1	0.052	1
4	4	8.671	299.1527		229538		23883	3	1	1	1	0.121	1
5	5	6.064	299.1525		146722		26146	2	1	1	1	0.076	1
6	6	11.598	250.1607		134252		19366	2	1	1	1	0.128	1
7	7	8.262	252.1204		63528		12743	2	1	1	1	0.058	1
8	8	5.307	296.9660	0.0019	28147		3522	4	1	1	1	0.072	1

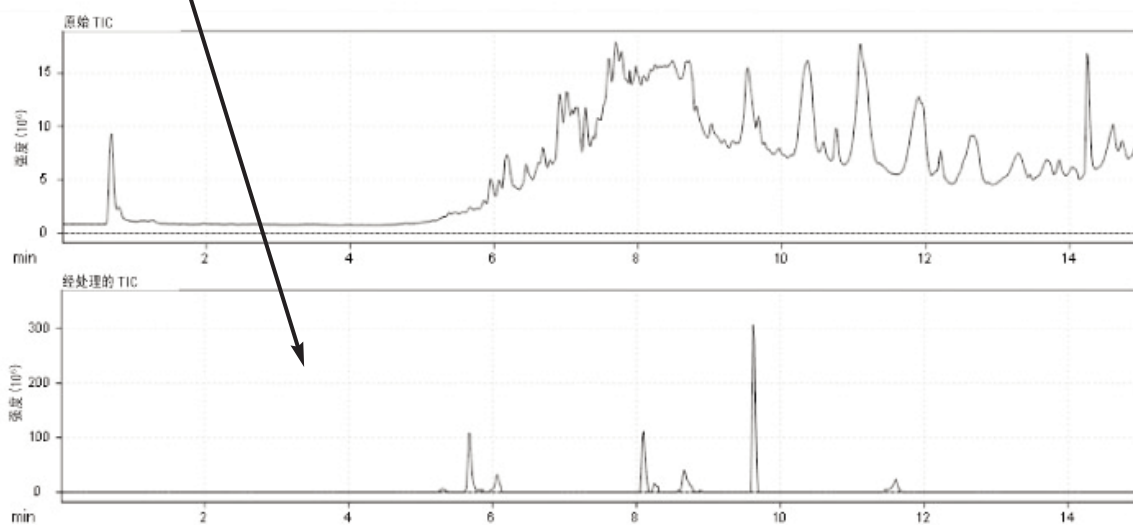


图 6. 与表 1 所列中性质量对应的 8 个特征。同时也展示了相应处理过的色谱图

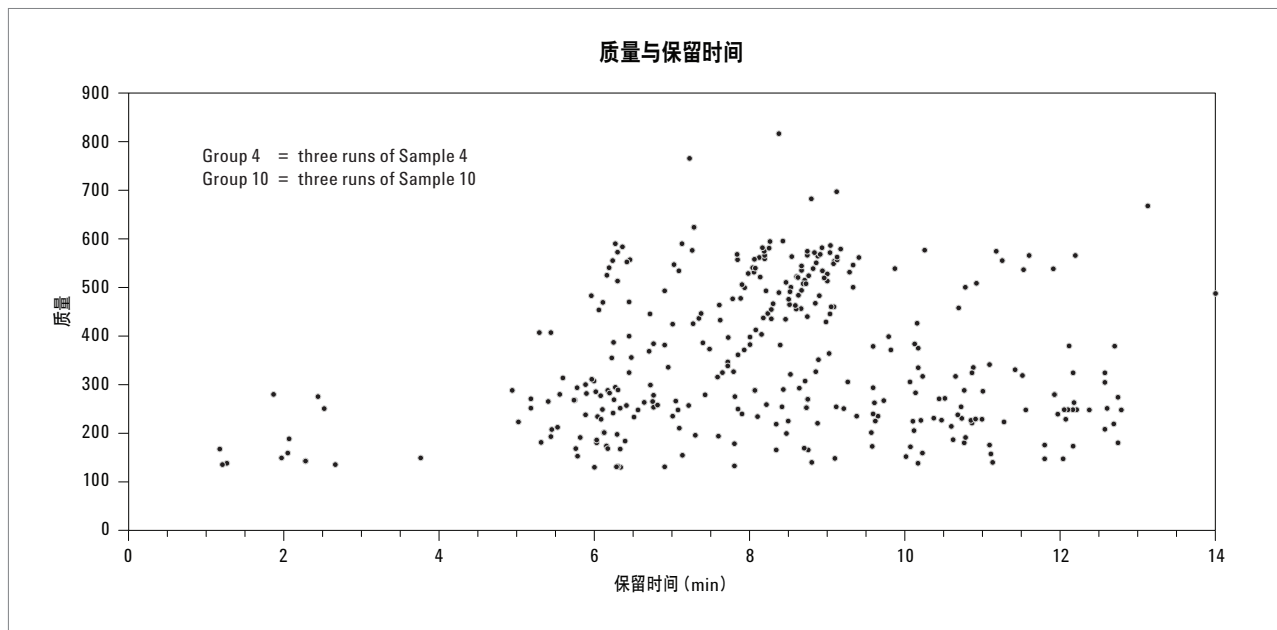


图 7. 组 4 和组 10 的共 346 个特征

例如，比较两个样品组之间的特征时，可以生成如图 8 所示的差异分析图。该图显示了组 10 与组 4 相类似的特征丰度。更明显的是，在保留时间 8.495 min 处，图 8 中与组 10 对应的特征数据点的强度大约是与组 4 对应的特征的 4 倍，对应于两者的  $\log_2$  比。点击图 8 中显示的这个数据点，我们可以看到这个特征被鉴定为苯海拉明，其化学式为  $C_{17}H_{21}NO$ ，质量精确度 0.7 ppm。见图 9。

我们也可以使用 Mass Profiler 根据在两个样品特征存在情况不同来对两个样品进行比较。在图 10 中我们可以看到这样的比较。

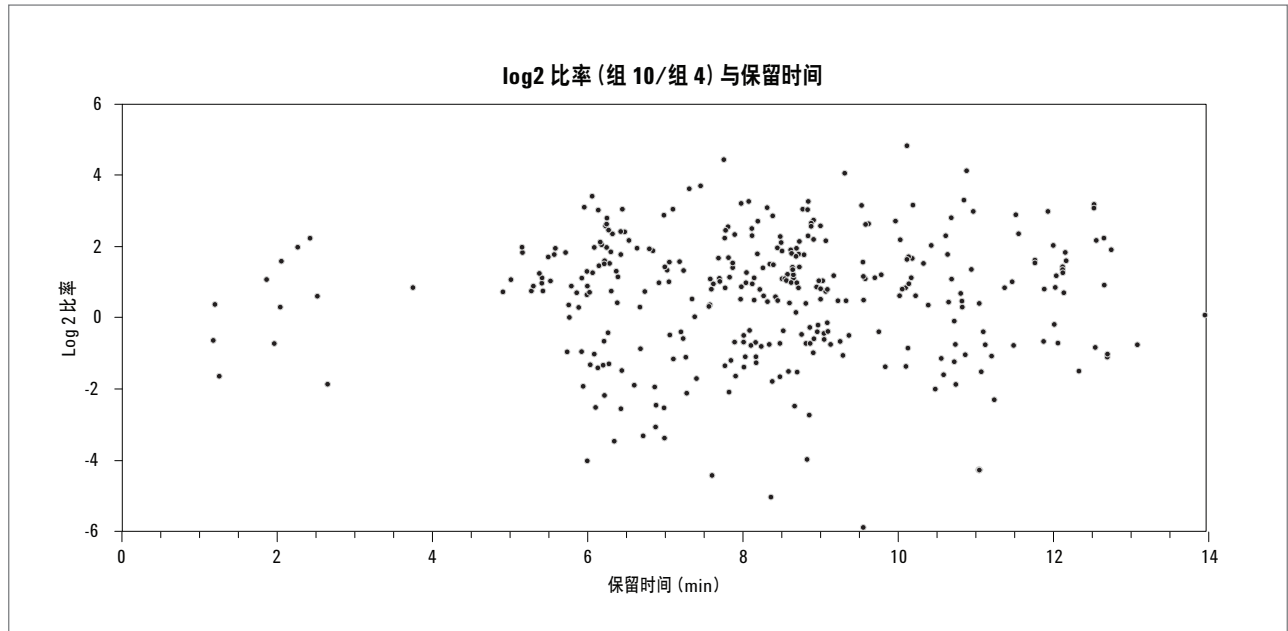


图 8. 组 4 和 10 中共有的但大小不同的特征

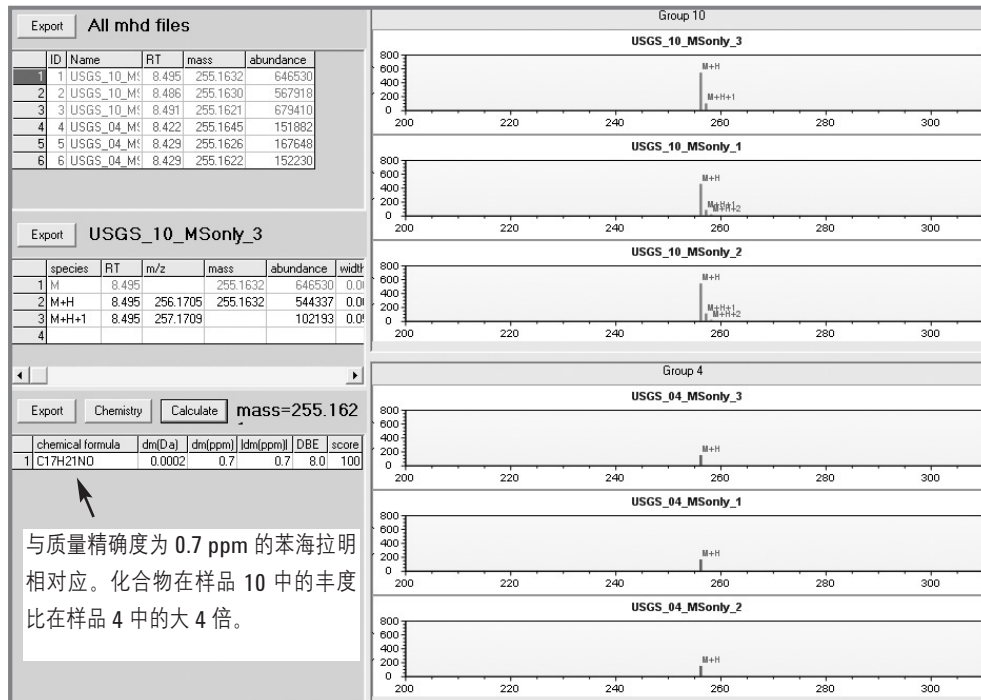


图 9. 保留时间 8.495 min 时与苯海拉明相对应的特征

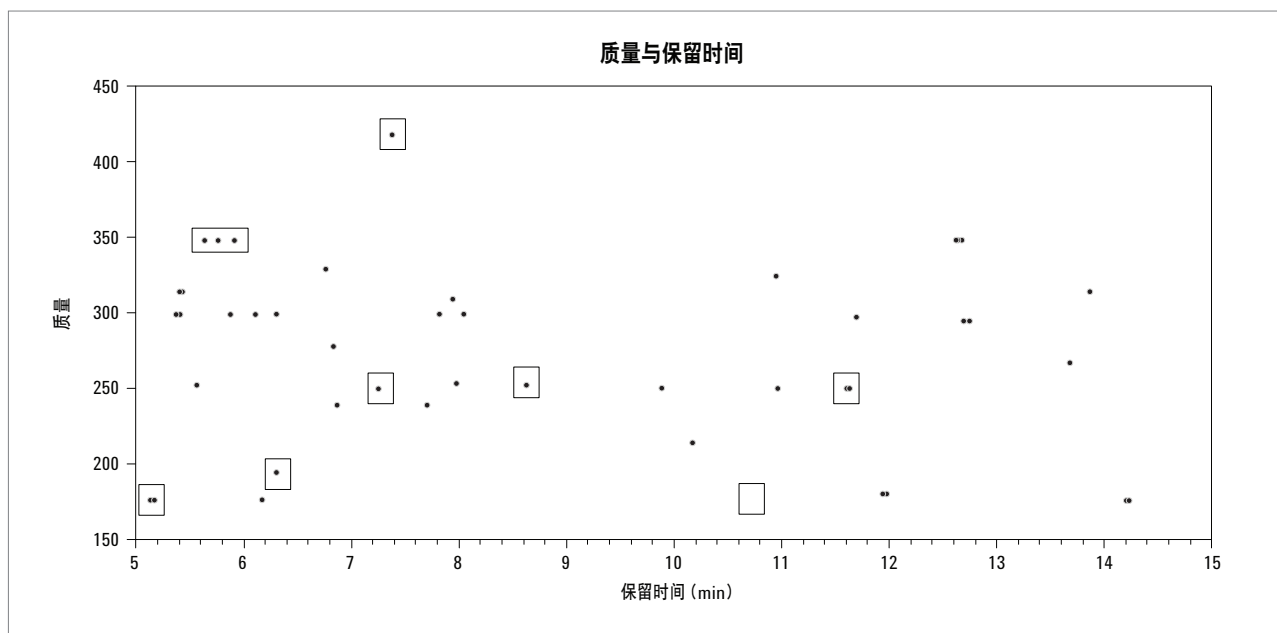


图 10. 只在组 4 (用方框标出) 或组 10 中出现的特征

采用 Mass Profiler 可以判断出总共有 33 个特征存在于组 4 或者组 10, 不同时存在于两个样品中。Mass Profiler 中的显示均为彩色的, 组 4 的特征为蓝色, 组 10 的特征为红色, 但由于安捷伦的应用一般都采用黑白印刷出版, 所以我们给组 4 的蓝色特征加上方框以方便观察。

迄今为止, 用全扫描质谱模式对所有数据进行采集。一旦鉴别出的化合物需要更多的结构信息, 或者需要对它进一步定量, 我们可以运行有针对性的串联质谱分析, 此时, 可以将特征的离子质量看做母离子, 将碎片看做具有精确质量的子离子。通过这些具有精确质量的子离子可以判断其化学式和可能的结构。因为四极杆飞行时间质谱在串联质谱模式下仍具有很高的质谱分辨率, 我们就可以得到每个离子非常窄的萃取离子色谱图, 并将它们汇总为定量信号。

在图 11 中, 我们可以看到咖啡因的精确质量串联质谱碎片, 串联质谱设置见液相质谱方法说明部分。咖啡因是很受关注的环境污染物, 因为许多药物中都含有这种成分。每个子离子化学式的产生都基于 C、H、N 和 O 各原子的可能排列。由于我们知道咖啡因的结构, 所以其碎片离子的结构可以通过其相应的化学式得到。碎片结构的生成使用 ACD/MS Frag-

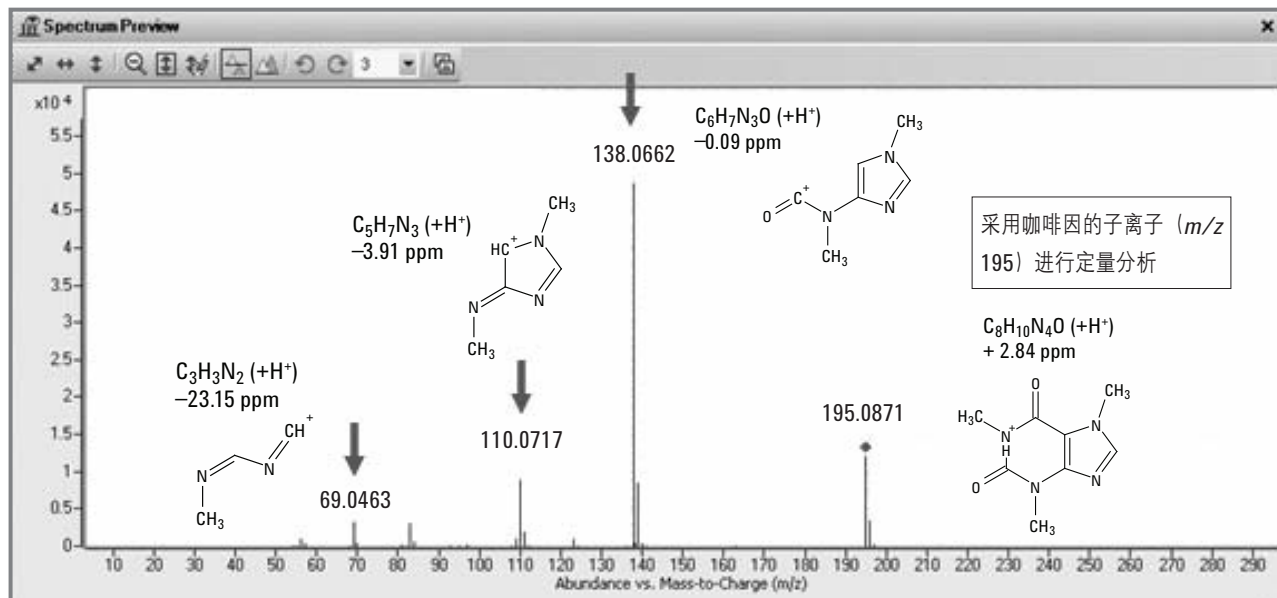
mentor 软件 (ACD Labs 第 10 版, 高级化学发展有限公司, 多伦多, 加拿大)

## 结论

使用全扫描质谱和串联质谱中的精确质量对化合物进行鉴定时, 四极杆飞行时间质谱是一个非常理想的仪器。精确质量可以得到化学式, 也可以在串联质谱分析得到子离子时给出结构信息。由于需要采用由这类仪器得到的大量数据来考察样品中可能含有的大量已知和未知化合物, 所以采用分子特征提取这类算法将有用特征从化学背景中筛选出来就非常重要。去除随机背景信号并发现有意义的同位素组信息后, 就可以从谱图中生成这些特征。

这种分析不仅对单个样品分析有用, 而且对于多样品间的比较也非常重要。可采用 Mass Profiler 的另一种算法进行这种比较。更特别的是, 这些比较可以使我们了解两个样品的共同特征以及它们在量上的差异。或者, 存在于某个样品中的哪些特征在另一个样品中不存在。一旦某些特征需要进一步研究, 就要对这些特征进行有针对性的串联质谱分析, 然后通过产生的子离子获得其结构信息。

采用精确质量测量数据和 C、H、N、O 元素进行化学式计算



建议的结构

图 11. 咖啡因的有针对性的串联质谱模式分析-产生的子离子可以用于结构鉴定和定量分析

## 参考文献

1. C. G. Daughton and T. A. Ternes, "Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?," *Environmental Health Perspectives*, 107, Suppl. 6, Dec 1999.
2. D. B. Chambers and T. J. Leiker, "A Reconnaissance for Emerging Contaminants in the South Branch Potomac River, Cacapon River, and Williams River Basins, West Virginia, April–October 2004," Open File Report 2006-1393, United States Geological Survey, <http://pubs.usgs.gov/of/2006/1393/>.

## 致谢

作者衷心感谢国家水质实验室-美国地质调查局 (莱克伍德, 科罗拉多州) 的 Stephen Werner 和 Ed Furlong 提供用于本文分析的样品的帮助!

## 更多信息

如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

如需了解有关本应用的更多信息, 请联系安捷伦科技有限公司的 Michael Zumwalt。

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。

本文中的信息、说明及技术指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2007

2007 年 10 月 12 日, 中国印刷

5989-7339CHCN



Agilent Technologies