

利用 LC/Q-TOF 和 Mass Profiler Professional 软件筛查水中新兴化学污染物

应用简报

环境

作者

Sylvain Merel 和 Shane Snyder
化学与环境工程系
亚利桑那大学
亚利桑那州图森市
美国

摘要

利用 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 和 Agilent Mass Profiler Professional 软件 (MPP) 灵敏地表征城市污水中复杂的化学成分。通过 MPP 多变量统计分析软件包对 Q-TOF 高分辨质谱数据进行处理，揭示了在污水处理过程中有机化学品分布类型的变化。利用这项技术能够测定循环水臭氧化过程中哪些有机污染物会减少、反弹和形成。MPP 的热图提供了分布图，可用来评估水质的细微变化并鉴别特定水源或处理过程中特有的新兴污染物。



Agilent Technologies

前言

大量报告表明, 水源 [1] 和饮用水 [2] 中存在痕量非受控污染物 (亦称新兴污染物)。对于美国国家环保局 (EPA) 污染物候选物列表 (<http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>) 体系中所列出的约 7500 种化学物质, 所检测到的这些化合物只占其中极小部分, 而对于近 8500 万指定 CAS 号的化学品其所占的比例更少 (<https://www.cas.org/>)。水中存在无数尚未鉴别的化学品, 而大部分还是不了解其对环境和公众健康的影响。

特别是, 由于人口迅速增长和迁徙造成的水源短缺, 区域性水源面临着前所未有的压力 [3]。许多城区都在寻找新的水源, 以补充饮用水的供应 [3]。水循环再利用的可能性最大, 包括使循环废水转化为饮用水。考虑到城市污水中已鉴定出的以及潜在存在的化学品数量惊人, 监测项目旨在尽可能选择最能体现处理效率的指示性化合物。有机污染物在进行氧化或生物处理会生成无数转化产物, 使得监测变得更加困难。在某些情况下, 处理后的副产物可能比初始污染物毒性更大 [4]。因此需要一种能够监控所有这些过程的检测方法, 确保选择最有效、最经济的污水再利用处理方法。

精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF) 质谱是检出和分离水中数千种不同的痕量有机化合物的良好平台, 因而是污水处理的理想监测工具。本应用简报介绍了能够对臭氧化处理 (一种灭菌和减少有机污染物的常用处理技术) 前后的污水中有机污染物的分布进行分析的方法。开发的方法是采用超高效液相色谱 (UHPLC) 和精确质量质谱法, 通过 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6540 Q-TOF 液质联用系统来分离和检出水中数千种有机化合物。对特定处理过程中有相似结局的一类化合物进行解析, 其中一部分化合物可用作氧化效率的指示物。最后, 如果某种污染物未来需要特别关注, 我们将构建 Q-TOF 数据档案以备再次挖掘, 从而无需保存任何样品或重新进行分析, 即可提供历史数据。

实验部分

试剂和标样

使用的所有溶剂均达到最高纯度, 适用于液相色谱/质谱分析。固相萃取所用的甲基叔丁醚 (MTBE)、甲醇和 HPLC 级水均购自赛默飞世尔科技公司。色谱分离使用的乙腈和 HPLC 级水购自 Burdick and Jackson, 甲酸购自 Sigma-Aldrich。

仪器

本实验采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统, 联用 Agilent 6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量四极杆飞行时间液质联用系统。仪器条件见表 1。

表 1. LC 和 Q-TOF MS 条件

液相色谱运行条件			
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 50 × 2.1 mm, 1.8 μm (部件号 959757-902)		
柱温	35 °C		
进样量	3 μL (每个样品重复进样三次)		
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 v/v B) 0.1% 甲酸乙腈溶液 v/v		
线性梯度	时间 (min)	%A	%B
	0	95%	5%
	1.5	95%	5%
	10	0%	100%
	13	0%	100%
流速	0.4 mL/min		
Q-TOF MS 条件			
离子模式	ESI 正离子模式, 仅用于 MS		
雾化器压力	40 psi		
毛细管电压	4000 V		
采集模式	2 GHz		
采集范围	25–3200 m/z		
采集速度	2.5 质谱图/秒		
分辨率	在 m/z 400 处为 20000		
准确度	< 2 ppm		

样品前处理

样品采自亚利桑那的一间污水处理厂，将其中部分的二级污水分流通过臭氧化设备进行处理。二级污水分别用 0、1.5、3、4.5 或 5.6 mg/L 臭氧处理后进行样品收集。

然后用玻璃纤维过滤板 (Whatman GF/F) 对每个样品进行过滤。小柱经过 5 mL MTBE、5 mL 甲醇和 5 mL 试剂级水预活化后用于进行固相萃取。将水样 (375 mL) 加载到小柱上，用 5 mL 试剂级水进行冲洗，在氮气流下干燥 30 分钟。然后依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 甲醇/MTBE (10/90) 对小柱进行洗脱。用氮气将洗脱液吹至 0.5 mL。

数据分析

用安捷伦 MassHunter 软件套装中的分子特征提取器（一种基于同位素离子簇检出化合物的运算软件）进行数据处理，然后用安捷伦 Mass Profiler Professional (MPP) 多变量统计分析软件包进行化合物比对。为了消除假像，使用 MassHunter 中的“分子式查找化合物”工具对已比对的特征进行递归分析，然后用 MPP

进行第二轮化合物比对。同时还用 MPP 进行统计分析，以鉴别不同样品类型之间的分布差异。

结果与讨论

特征提取和化合物比对

将三次进样的总离子色谱图 (TIC) 叠加，可以看出不同浓度臭氧处理后存在某些差异，但因这些变化太复杂，而不能直接进行解析 (图 1)。需要进行特征提取，提取每张色谱图中的各化合物，为每个样品建立一个详尽的轮廓图。但是，同一化合物在两次进样的保留时间可能发生轻微差异，使 MassHunter 将其识别为两个不同的化合物。要修正这一点，在 MassHunter 进行特征提取后，用 MPP 进行化合物比对。这一过程共鉴别出 24779 种化合物。初步过滤（空白扣除）鉴定出只在污水样品中检出的 23574 种化合物。其中，13996 种化合物至少 2 次被检出（不同重复进样或不同样品），将其用于递归分析，进一步排除假阳性。

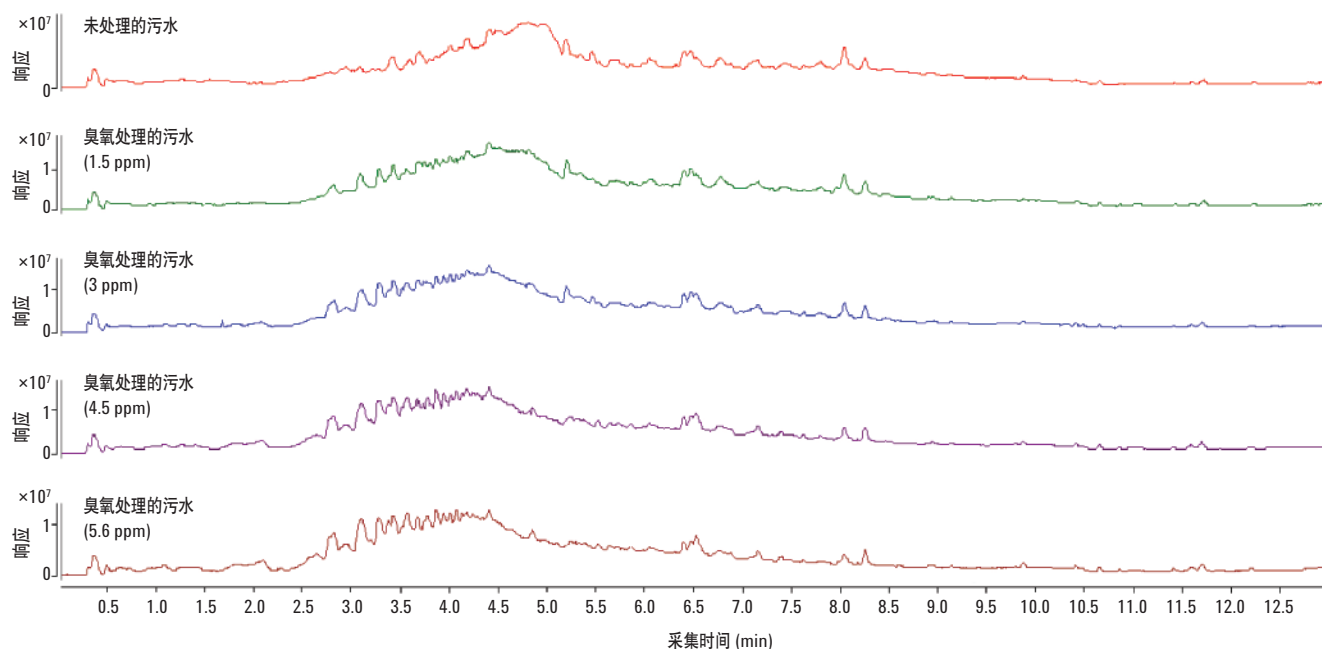


图 1. 未处理污水以及使用各剂量臭氧处理的污水的总离子色谱图 (TIC)

递归分析

将初筛通过的 13996 种化合物以 CEF 文件导出，并导入到 MassHunter 定性分析软件中。再次检查色谱图，用“分子式查找化合物”工具专门搜索这些化合物，然后将得到的化合物返回到 MPP 中，进行第二轮化合物比对和过滤。共有 12889 种化合物通过了这次递归分析。其中，选择用于统计分析的化合物必须是在空白（HPLC 级水提取物）中没有出现过，而且至少为统计分析所选用的一个臭氧剂量上重复三次分析中均 100% 被检测出的化合物，共有 9493 种化合物。

主成分分析

用 MPP 对数据进行主成分分析 (PCA)，以确定这些样品是否能根据所承受的臭氧剂量来加以区分。图 2 显示，每个臭氧剂量都可以彼此区分，每个剂量三次重复处理的样品聚类非常相近，表明具有良好的重现性。

系统聚类分析

为进一步表征和明确臭氧化作用对污水中所存在的化合物的影响，我们对样品进行了系统聚类分析 (HCA)，找到了对臭氧化作用具有不同响应的几组化合物 (图 3)。臭氧去除了两组 (A 和 B) 化合物，而其他三组 (C、D 和 E) 化合物则是在臭氧处理过程中生成的。有几种化合物实际上没有受到臭氧处理的影响 (F)。HCA 中可以观察到更详细的信息。例如，由 B 组可见，在去除 B 组化合物时需要不同剂量的臭氧，因此又将其分成了三个亚组 (B1、B2 和 B3, 图 4)。

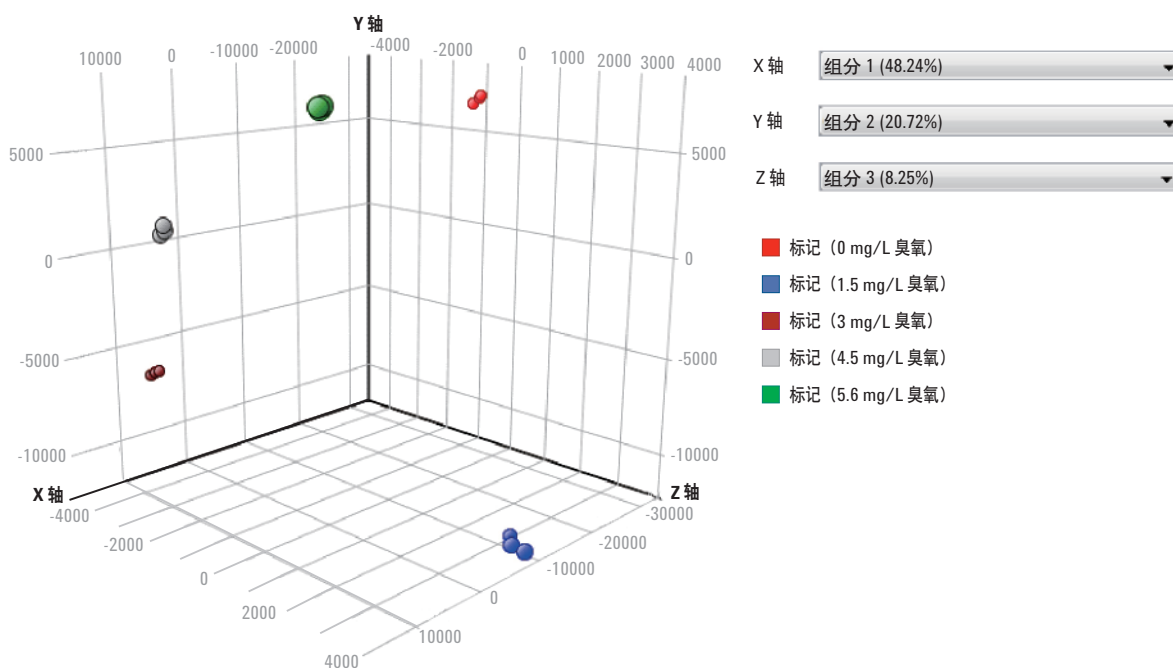


图 2. PCA 表明可以清晰区分使用不同剂量臭氧处理的样品。每组样品重复分析三次，聚类仍非常接近。

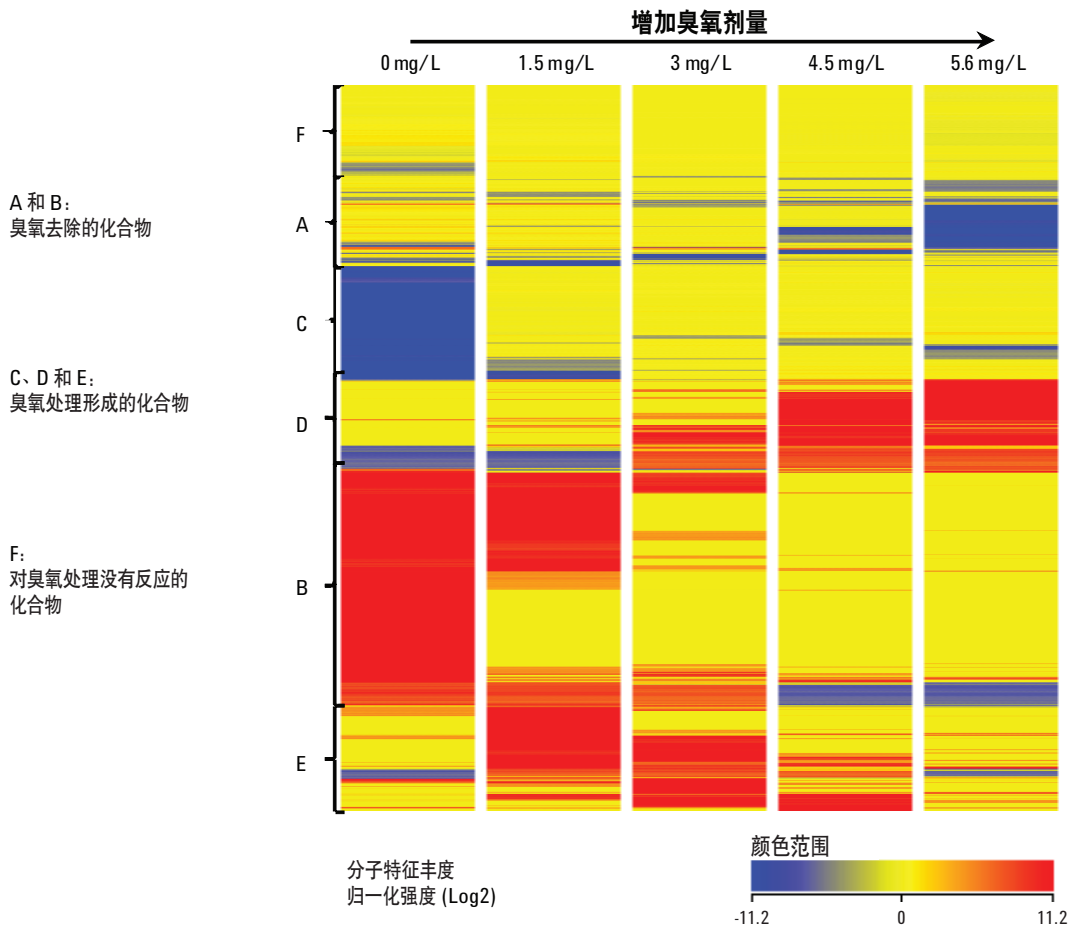


图 3. HCA 显示了对臭氧处理有不同响应的化合物组别

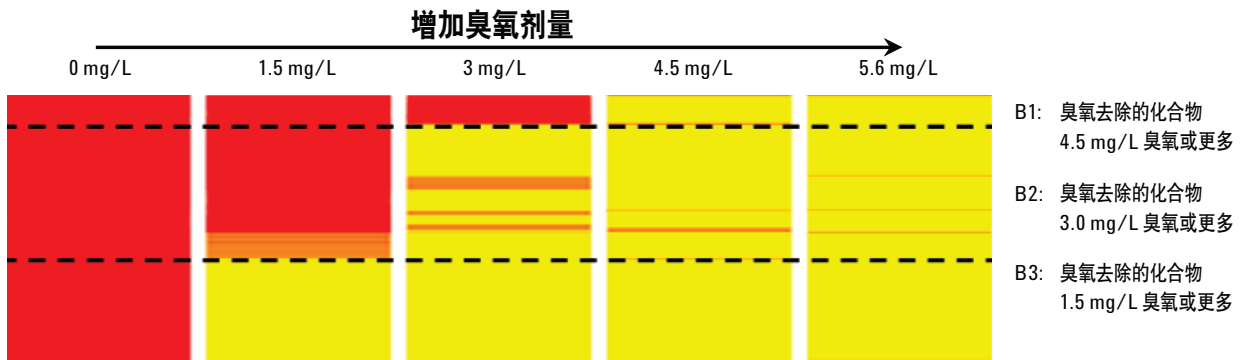


图 4. 图 3 中 B 组的展开图，显示了三个需要用不同剂量的臭氧才能将其从污水中去除的亚组 (B1、B2 和 B3)

方差分析

为了进一步了解各种剂量臭氧处理对污水的影响，我们采用方差分析 (ANOVA) 结合 Tukey 检验，鉴别出在施加不同剂量臭氧中丰度变化明显的化合物。ANOVA 从 9493 个化合物中鉴别出了 8244 个丰度在不同臭氧剂量下变化明显的化合物 (p 值 < 0.05)。通过 Tukey 检验得出一个表格，其比较了经不同剂量臭氧处理的各样品，显示了丰度变化明显和不明显的化合物数量 (表 2)。

表 2. 丰度随臭氧剂量发生变化的化合物数量 (方差分析 p 值 < 0.05)

	臭氧剂量 (ppm)					
	0	1.5	3.0	4.5	5.6	
臭氧剂量 (ppm)	0	8244	4548	5524	6083	6150
	1.5	3736	8244	3083	4299	4843
	3.0	2720	5161	8244	2476	3395
	4.5	2161	3945	5768	8244	2226
	5.6	2094	3401	4849	6018	8244

丰度变化的化合物

丰度无变化的化合物

一组样品与其自身的对比

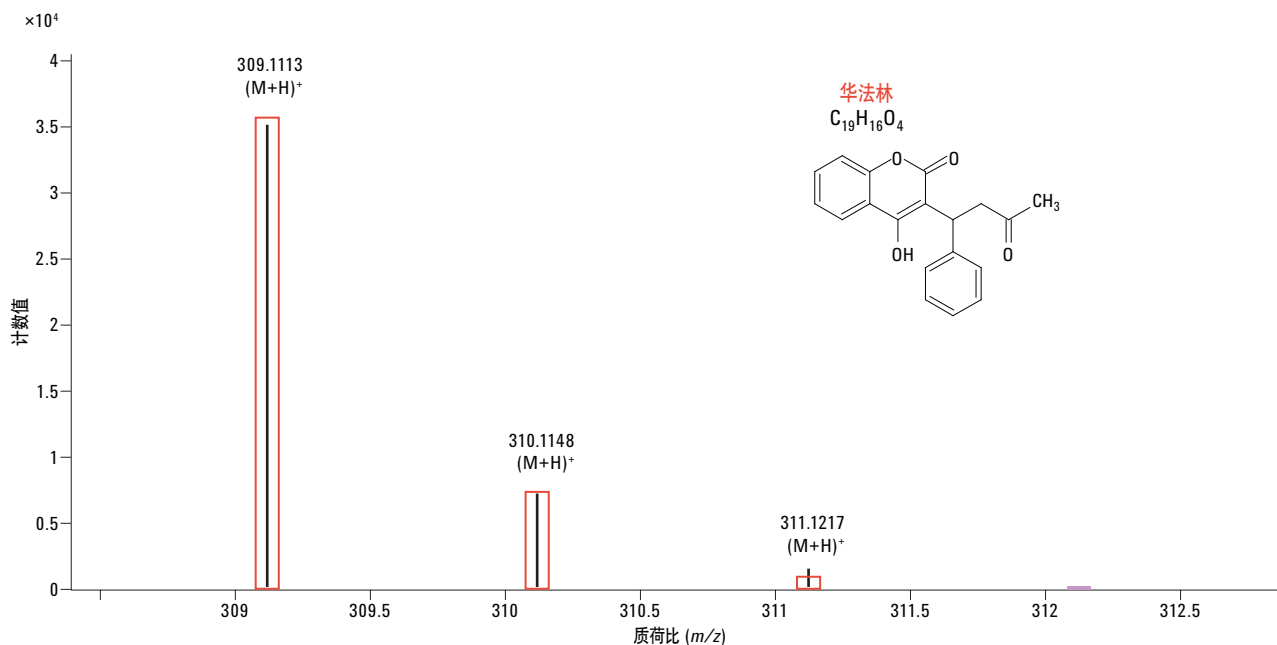


图 5. 使用 MPP ID 浏览器和安捷伦 METLIN PCDL 数据库鉴定出 B3 亚组中的一个化合物是华法林。鉴定得分值为 97 (最大值为 100)，红色矩形代表华法林的理论离子簇

化合物鉴定

我们不可能对污水中所有化合物进行监测来判断其是否被去除。所以另一办法是从每组 (B1、B2) 中选一种化合物进行监测，将其作为指示物来评估其他发生相似变化的化合物。为此，可使用 MPP 中的 ID 浏览器和相关化合物数据库。例如，当从 B3 亚组中随机选择一种化合物时，使用 MPP 中的“查找相似化合物”工具可鉴别出 953 种化合物在臭氧化处理过程中具有相似变化，其相关系数 $0.95 < R^2 < 1$ 。将该列表导出到 ID 浏览器中，在安捷伦 METLIN 个人化合物数据库和谱库 (PCDL) 中进行检索匹配。鉴定出其中一种化合物为华法林，这是北美使用最广泛的抗凝血处方药 (图 5)。因此，可以将其作为其他 952 种也能轻松被臭氧去除的化合物的指示物 (亚组 B3)。

结论

污水中含有大量的化合物，大部分都不能通过常规的分析进行监测。使用 Agilent 6540 超高分辨 (UHD) 精确质量 Q-TOF 液质联用系统的非目标 LC/Q-TOF 分析并结合安捷伦 Mass Profiler Professional 软件的统计分析，可以区分抗臭氧性不同的化合物组别。某些化合物对臭氧化作用没有反应，其他的化合物则根据臭氧剂量的不同出现一定程度的减少，而某些化合物则是在臭氧化过程中形成的。因此，本应用简报介绍的方法可以作为监测水处理过程中水质变化的灵敏工具。

参考文献

1. D.W. Kolpin, *et al.* "Pharmaceuticals, hormones, and other organic waste contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance" *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1202-1211 (2002)
2. M. Benotti, *et al.* "Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking waters" *Environ. Sci. Technol.* **43**, 597-603 (2009)
3. R.G. Arnold, *et al.* "Direct potable reuse of reclaimed wastewater: it is time for a rational discussion" *Rev. Environ. Health* **27**, 197-206 (2012)
4. National Research Council "Water Reuse: Potential for Expanding the Nation's Water Supply Through Reuse of Municipal Wastewater" Washington, DC: The National Academies Press, 2012
5. K. Ikehata, M. Gamal El-Din, S.A. Snyder "Ozonation and advanced oxidation treatment of emerging organic pollutants in water and wastewater" *Ozone-Science & Engineering* **30**, 21-26 (2008)

更多信息

有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站
www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

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，2014
2014年4月24日，中国印刷
5991-4417CHCN



Agilent Technologies