



新兴环境污染应用文集

**更全面、更准确：
准确鉴定可疑化学污染物**

The Measure of Confidence



Agilent Technologies

鉴定空气、水和土壤中的新兴污染物

当今的环境分析结果必须比以往任何时候都更可靠、更高效、更高质。遗憾的是，环境和生物基质中的药物、PCP、农药及其他潜在毒性化合物可能难以检出。

更为复杂的是，市售电子电离 (EI) 谱库并不一定含有鉴定目标化合物所需的质谱数据。

将精确质量数的强大功能应用于鉴定新兴（或不断变化的）污染物

AGILENT 7200 系列 GC/Q-TOF 生成的精确质量数 MS/MS 谱图有利于建立碎片离子之间的联系，从而确定结构相关性。这一高分辨率系统能够在保持质量准确度的同时，在 MS/MS 模式中以快速采集速率运行，从而帮助您为每个峰采集多个 MS/MS 数据而无需多次运行。

内容提要

在本文集中，您将了解到涵盖农药、SVOC 和三氯蔗糖等化合物的现有及新兴应用。同时，我们的产品和应用专家将帮助您在满足严格监管标准的同时最大程度提高工作效率。

目录

交互式文件用户：单击下列标题可获取相应信息。

环境基质.....	4
采用高分辨质谱分析法 (LC/Q-TOF/MS) 检测水中的药物	5
水力压裂废水的精确质量数分析：	
利用 LC/Q-TOF-MS 对聚乙二醇表面活性剂进行鉴定	13
使用安捷伦 GC/Q-TOF 对食品中的 740 多种农药残留进行筛查	19
使用 Q-TOF LC/MS 和 Mass Profiler 软件对河水进行环境分析	33
使用 LC/Q-TOF 和 Mass Profiler Professional 软件对水中的新兴污染物进行筛查	37
使用精确质量数 Q-TOF LC/MS 系统和分子结构关联软件对三氯蔗糖进行鉴定和裂解研究	45
使用氯元素过滤器对环境样品的精确质量数据进行分析	53
采用超高分辨率 LC/Q-TOF MS 和精确质量数分析环境样品：	
多高的分辨率才能达到要求？	59
鉴定阿尔伯达湖水中的未知微囊藻毒素	65
GC/Q-TOF 农残筛查工作流程	77
气溶胶颗粒上半挥发性有机化合物 (SVOC) 的筛查	87
环境暴露与生物基质	95
利用血液暴露组学研究发现疾病起因	96
利用 GC/MS/MS 分析少量人血浆中的持久性有机污染物 (POP)	104

如需搜索随附应用简报中的词语或短语，请单击下方的搜索按钮打开 Acrobat 中的“搜索”窗口。



环境基质

环境基质中未知物的非靶向筛查

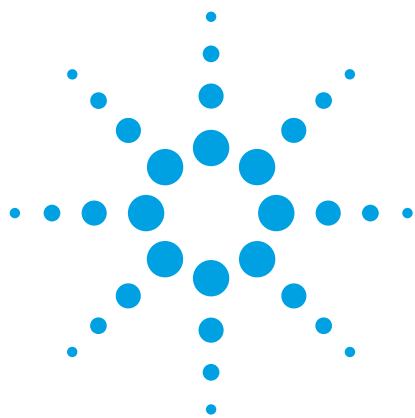
暴露于水和土壤中的化学污染物会对全人类造成潜在的健康风险。对新兴污染物（尤其是存在于水中的药物和个人护理产品）对生物群和人群产生影响的担忧促使研究人员对环境基质中痕量化学污染物的范围和来源鉴定投入了更多精力。限制暴露和提高公共安全的要求促进了监测土壤污染物的全球环境非靶向筛查方案的实施以及废水处理和饮用水净化效率的提高。

对多数生物与化学相关污染物进行以环境行为为导向的成功表征需要采用先进的质谱技术进行可疑和非靶向筛查。安捷伦科技公司为新兴污染物的研究提供了成熟可靠的全程解决方案。在不影响数据质量和谱图分辨率的情况下，我们用于可疑和非靶向筛查的工具可通过减少假阳性结果快速提供结果。请联系安捷伦，我们可以帮助您可靠地鉴定目标基质中的多数相关污染物。

► [返回目录](#)

► [返回前言](#)

www.agilent.com/chem/environmental



采用高分辨质谱分析法 (LC/Q-TOF/MS) 检测水中的药物

应用简报

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
美国

摘要

使用安捷伦四极杆飞行时间质谱仪和软件工具能够鉴定和表征水源中浓度低至万亿分之一 (ppt) 级别的 100 多种药物及其代谢物，包括那些使用其他方法很难区分开的同重化合物以及同分异构体。

前言

距离首次报道环境中的药物残留已经过去了二十多年。服用的药物从人体内排出后会进入污水处理厂，它们在污水处理厂中不能被完全去除，最终会进入到环境中。这些药物在环境中无处不在，它们可能会存在于废水、地表水以及地下水中。这些药物，尤其是抗抑郁类药物和 β -受体阻滞剂在环境中的浓度越来越高 [1]。

为了确定药物残留的潜在健康风险，监测水体中的药物浓度正日益受到全球监管机构的关注。但是，此类药物的浓度通常都非常低 (ng/L 水平)，所以我们需要使用高选择性、高灵敏度的检测方法。同时也需要使用非靶向方法，以确保能够检出所有的药物污染物及其降解产物和代谢物 [2]。

采用液相色谱/四极杆飞行时间质谱 (LC/Q-TOF/MS) 的方法能够提供药物分析所需要的灵敏度和选择性，还能对水中的药物进行非靶向筛查。本应用简报介绍了使用 Agilent 6540 四极杆飞行时间液相色谱质谱联用系统和相关软件工具（包括分子特征提取器、分子式生成器和精确质量数据库）来检测、鉴定和定量水中超低浓度的药物。

实验部分

试剂和标样

所有的标准溶液 (100 µg/mL) 均购自 Cerrilant（美国德克萨斯奥斯汀）。氘代标样购自 Cambridge Isotopes（美国马萨诸塞州剑桥）。高效液相色谱级乙腈和甲醇购自 Burdick and Jackson（美国密歇根马斯基根）。甲酸购自西格玛奥德里奇公司（美国密苏里州圣路易斯）。用纯甲醇将 100 µg/mL 的标液稀释成 1 µg/mL 的单标储备液并于 -18 °C 下保存。用乙腈和水将储备液稀释成 10% 乙腈和 90% 水的混合液，以此作为工作标准溶液用于液质联用分析。

仪器

本实验采用 Agilent 1200 Infinity 液相色谱系统，联用 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。

样品前处理

采用自动化 Gilson SPE 系统和 Oasis HLB 小柱提取水样 (100 mL)，并用 6 mL 甲醇洗脱 [2]。用氮气蒸发装置在水浴中将甲醇洗脱液蒸至 0.5 mL 的最终体积。

数据分析

使用了包括分子特征提取器、分子式生成器、分子结构关联计算以及精确质量数据库等多种安捷伦软件工具来鉴定药物化合物。同时还使用了包括氯过滤器在内的开发人员改编版软件 [3]。

表 1. 液相色谱和四极杆飞行时间质谱条件

液相色谱运行条件	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8 色谱柱， 4.6 × 150 mm, 3.5 µm 填料 (部件号 963967-906)
柱温	25 °C
进样量	20 µL
流动相	A = 0.1% (体积比) 甲酸水溶液 B = 乙腈
线性梯度	10% B 保持 5 min， 然后在 25 min 时间里 B 由 10% 升高至 100%
流速	0.6 mL/min
四极杆飞行时间质谱条件	
离子模式	ESI，正离子模式和负离子模式
雾化器压力	45 psi
毛细管电压	3500 V
检测器采集速率	2 GHz
分辨率	在 m/z 922 处为 25000
准确度	< 2 ppm

结果与讨论

检验水样中的药物

分子特征提取 (MFE) 能够将离子按化合物 (特征) 分组, 然后生成提取离子色谱图。MFE 可以提取强度最强的前 100 种化合物, 也可以根据需求提取前 1000 种甚至更多种化合物。提取的化合物越多, 研究样品所需要的时间也就越长。时间窗口也就需要做相应的调整。图 1 中所示为河水样品的总离子流图 (TIC), 该图中给出了样品中的 1498 种分子特征。

然后可以使用精确质量数据库根据精确质量数和保留时间来鉴定提取出来的分子特征。例如, 在 MFE 后使用安捷伦法医学数据库检测出了化合物加巴喷丁。图 1 中所示谱图是在没有使用 MS/MS 的情况下得到的。化合物右啡烷是止咳药右美沙芬的人类代谢产物, 可以根据去甲基右美沙芬的精确质量数鉴定水样中的右啡烷。借助上述以及其他工具, 我们从地表水中鉴定出了 100 多种药物化合物 [2]。

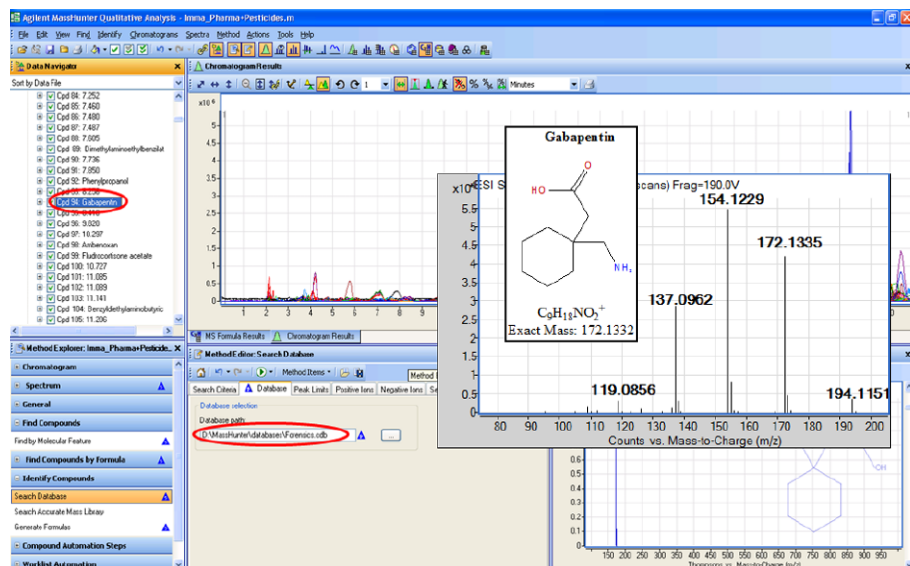


图 1. 河水样品的分子特征提取结果, 识别出了 1498 种分子特征。其中加巴喷丁是通过法医学数据库鉴定出来的

表征水样中的药物

许多软件工具都可以用于鉴定特定药物及其代谢产物。例如，我们通过改编 MFE 和分子式生成器 (MFG) 得到了氯质量数过滤器软件工具，并借助该工具在河水样品中发现了抗抑郁药拉莫三嗪 [3]。我们先运行 MFE，然后设置 MFG 以包含至少一个氯原子。

在这个例子中，我们设置的氯原子数最多为两个，最少为一个。然后软件会将从 MFE 得到的所有含氯原子的化合物进行分类，从而鉴定出拉莫三嗪（图 2）。

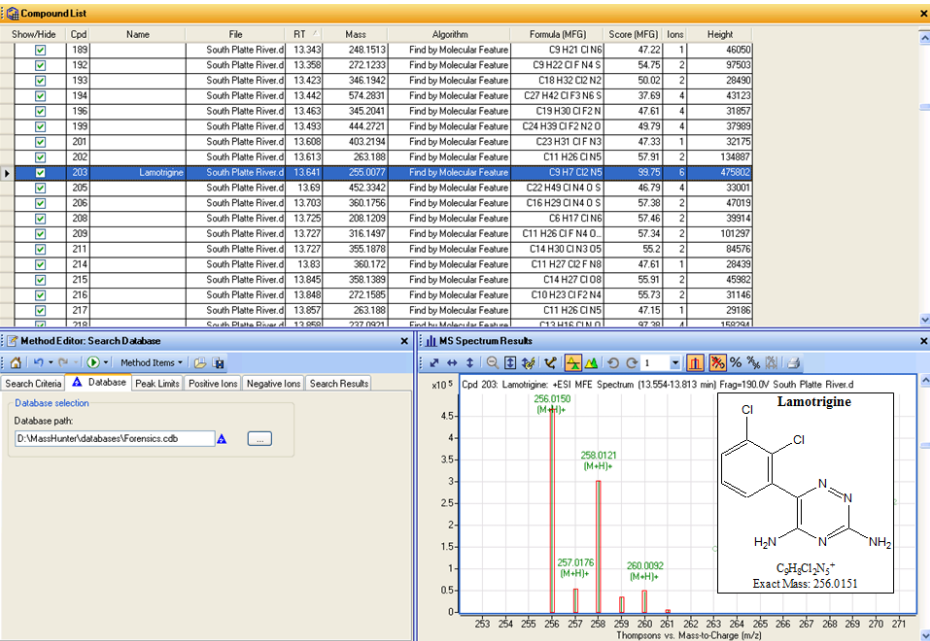


图 2. 使用氯质量数过滤器鉴定拉莫三嗪

使用诊断离子工具和 MS/MS 分析还能鉴定出水样中拉莫三嗪的代谢物。在提取 m/z 256 离子后，所得到的离子色谱图在这个名义质量数处包含多个离子。在大约 9 min 处的其中一个峰的质量数与拉莫三嗪完全相同，说明这是拉莫三嗪的异构体或相关代谢物。全谱显示的名义质量数为 m/z 432，其与 m/z 256 相差一个葡萄糖苷酸，或者 176 个质量数单位。哺乳动物的药物新陈代谢过

程通常会产生葡萄糖苷酸。我们开展了两个 MS/MS 实验来确认拉莫三嗪的代谢物。首先，对 m/z 432 离子进行 MS/MS 分析以证明 m/z 256 离子来源于 m/z 432 离子（图 3）。然后，通过增加碎裂电压并对 m/z 256 进行 MS/MS 分析开展伪 MS³ 实验，得到与母体化合物拉莫三嗪一致的谱图（图 3）。通过分析 2-N-葡萄糖苷酸拉莫三嗪的纯标准品也证实了这一发现。

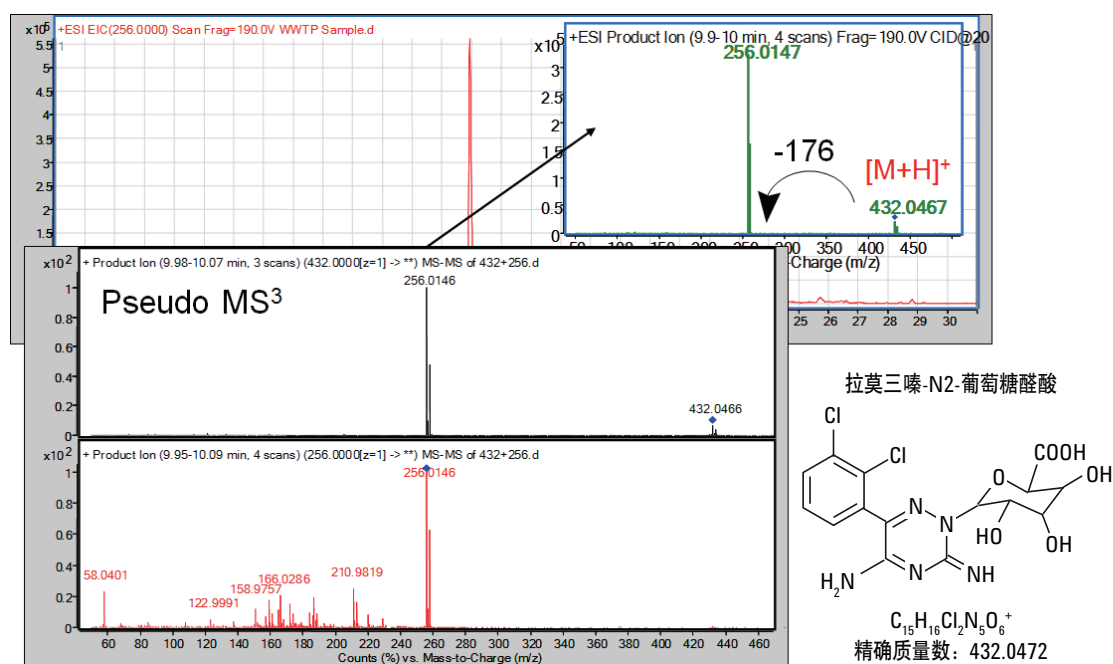


图 3. 用于确认拉莫三嗪葡萄糖苷酸代谢物的诊断离子和 MS/MS 分析

区分同分异构体和同重化合物

四极杆飞行时间质谱仪是区分和鉴定水样中药物同重化合物和同分异构体的必要工具。同重化合物具有相同的名义质量数，而同分异构体有着相同的分子式以及相同的精确质量数。我们可以根据精确质量数分离同重化合物，但是分离同分异构体通常需要同时使用 MS/MS 和色谱分离技术。同分异构体在保留时间、精确质量数和 MS/MS 碎裂上的差异，以及特征同位素签名和同位素质量亏损都可以用于同分异构体的阳性鉴定 [2,4]。

废水中通常会发现同重的药物化合物对：拉莫三嗪和羟基安非他酮，这两种物质的保留时间仅相差 0.2 min。但是它们的精确质量数相差 0.0948 个质量数单位。LC/Q-TOF/MS 在 25000 的分辨率下能够实现 m/z 256.0149 和 256.1096 的基线分离。在该条件下不仅这些离子可以实现分离，它们的同位素签名也在谱图中实现了基线分离（图 4）。值得注意的是拉莫三嗪有两个氯同位素模式，羟基安非他酮有一个氯同位素模式。一个氯原子在 A+2 处能给出大约 30% 的同位素模式，两个氯原子在 A+2 处能给出大约 60% 的同位素模式 [3]。我们对质谱图进行叠加以显示质谱仪的分辨能力。

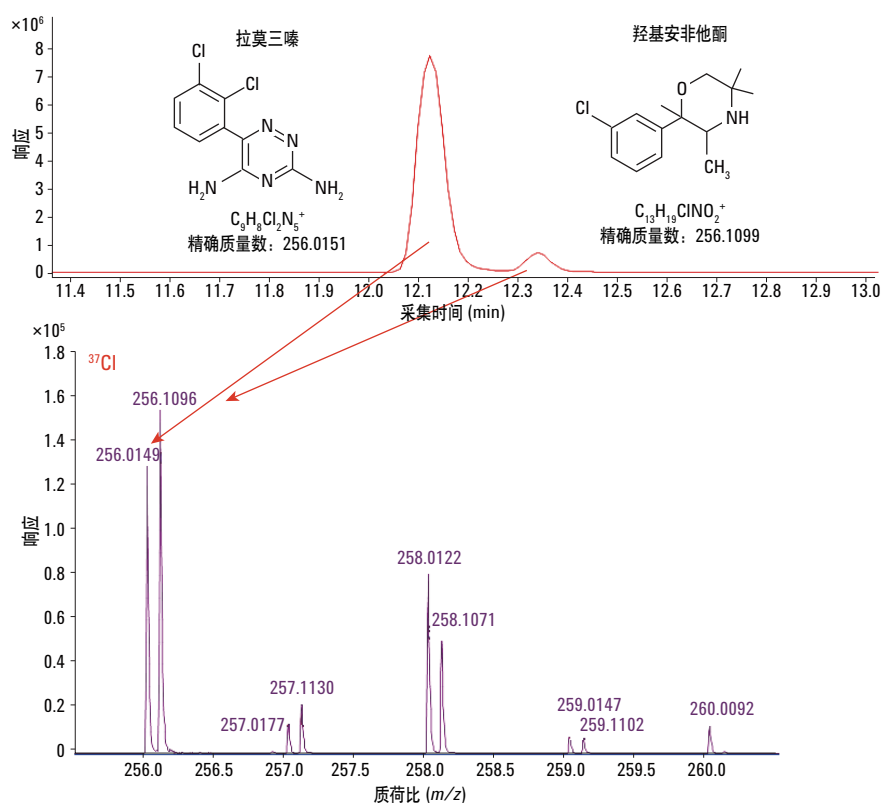


图 4. 借助精确质量数区分同重化合物对。拉莫三嗪和羟基安非他酮相差 0.0948 个质量数单位，在保留时间上相差 0.2 min。请注意，这两种化合物的同位素签名实现了基线分离

去甲基文拉法辛和曲马多是一对同分异构药物化合物，它们有着相同的分子式，因而精确质量数也相同 (m/z 264.19587)。它们在保留时间上有细微的差别，但是它们的两个碎片离子有着完全相同的精确质量数。而 MS/MS 能够鉴定 m/z 201.1274 处的碎片离子，这个离子为去甲基文拉法辛所独有（图 5）。

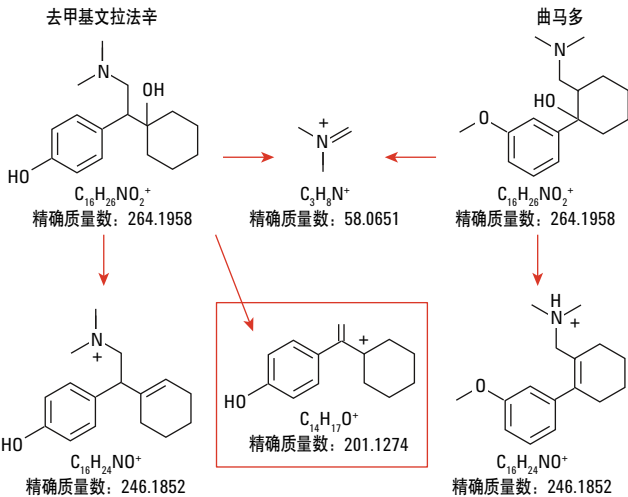


图 5. 用于区分去甲基文拉法辛和曲马多同分异构体的 MS/MS 离子对

监测水源中的药物

6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量数四极杆飞行时间液质联用系统的精确质量数分析能力以及软件工具能够监测不同水源中的 100 多种药物。在这些化合物及其代谢物中，有 14 种在美国的地表水中是最常见的（表 2 中以黄色突出显示的化合物）。其中很多都是抗抑郁类药物及其代谢物以及一些抗生素 [2]。值得注意的是，拉莫三嗪广泛存在于地表水中（在地表水源中的检出率为 97%），平均浓度大于 400 ng/L。我们的研究表明这些化合物在污水和下游水体中以及地下水中的浓度存在着一定的关系 [1]。

表 2. 美国境内地表水中发现的 36 种药物的鉴定结果，包括他们的平均浓度以及在水样中的检出率。以黄色突出显示的是最常检出的药物

化合物	在水样中的检出率 (%)	平均浓度 (ng/L)
1,7-二甲基黄嘌呤	10	110
10,11-二羟基-卡马西平	45	80
10-羟基-卡马西平	85	255
阿替洛尔	74	166
安非他酮	68	140
咖啡因	70	220
立痛定	95	350
西替利嗪	82	70
西酞普兰	79	85
甲红霉素	75	46
可铁宁	22	40
去甲基-右啡烷	65	10
去甲基文拉法辛	78	84
右啡烷	75	50
地尔硫卓	69	47
苯海拉明	80	57
赤式羟基安非他酮	78	180
红霉素	55	137
无水红霉素	35	62
氟西汀	25	65
加巴喷丁	44	54
吉非罗齐	74	95
羟基安非他酮	75	150
布洛芬	20	21
拉莫三嗪	97	455
美托洛尔	91	237
美托洛尔酸	85	74
2N-葡萄糖苷拉莫三嗪	68	95
萘普生	64	22
去甲基西酞普兰	66	74
心得安	88	53
新诺明	95	320
噻菌灵	75	188
三氯卡班	64	96
甲氧苄啶	76	264
文拉法辛	78	310

结论

安捷伦液相色谱/四极杆飞行时间质谱系统和软件是鉴定和表征水源中多种药物的强大工具。快速分析能够监测十亿分之一 (ppb) 甚至万亿分之一 (ppt) 级别的 100 多种已知药物。分子特征提取器、分子式生成器、分子结构关联计算、碎裂途径以及氮质量数过滤器都可以用于表征单个化合物及其代谢物。四极杆飞行时间分析尤其适用于分离和鉴定同重化合物和同分异构体, 使用其他方法则很难分析这些化合物。

参考文献

1. J.H. Writer, I. Ferrer, L.B. Barber, and E.M. Thurman "Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals in and metabolites in 24 Minnesota Rivers and wastewaters" *Science of the Total Environment* 461-462, 519-527 (2013).
2. I. Ferrer, and E.M. Thurman "Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *J. Chromatography A* **1259**, 148-157 (2012).
3. I. Ferrer, and E.M. Thurman "Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *Anal. Chem.* **82**, 8161-8168 (2010).
4. E.M. Thurman, and I. Ferrer "The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formula by accurate mass." *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2807-2816 (2010).

更多信息

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。

www.agilent.com/chem/cn

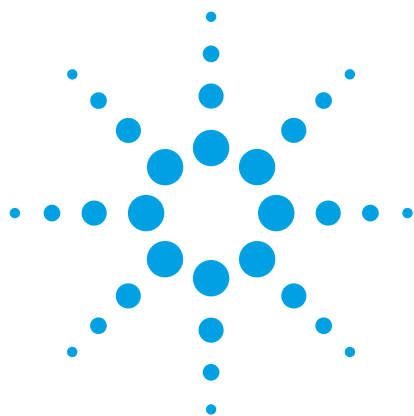
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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, 2013
中国印制
2013 年 10 月 31 日
5991-3261CHCN



Agilent Technologies



Accurate Mass Analysis of Hydraulic Fracturing Waters: Identification of Polyethylene Glycol Surfactants by LC/Q-TOF-MS

Application Note

Authors

E. Michael Thurman and Imma Ferrer
Center for Environmental Mass
Spectrometry
Department of Environmental
Engineering
University of Colorado
Boulder, CO
USA

Abstract

A combination of UHPLC followed by LC/Q-TOF-MS was used to detect suites of polyethylene glycol compounds (PEGs) that occur in flowback water samples from hydraulic fracturing. The Kendrick Mass Defect was applied to differentiate the various adducts within a suite of PEGs. A database of the accurate masses along with their retention times by UHPLC has been designed to enable rapid and accurate analysis of either groundwater or flowback samples from hydraulic fracturing. Forty PEGs and their various adducts and multiply-charged ions can be identified in less than 2 minutes of computer time.



Agilent Technologies

Introduction

Hydraulic fracturing (fracking) extracts oil and gas by forcing fluids into oil and gas rich shale deposits. The fracking fluids contain a mixture of proppants (sand), surfactants, biocides, inorganic salts, and other compounds intended to facilitate the release of the trapped gas. More than 7,000 wells have been drilled in Colorado alone, and reports of groundwater contamination have occurred most notably in Wyoming, New York, and Pennsylvania [1]. The first water that returns from the fracking process (flowback) has the potential to contaminate nearby aquifers or surface water. Care is taken to recycle the flowback water, or to dispose of it properly, although the Safe Drinking Water Act does not apply to hydraulic fracturing solutions [2]. Thus, there is a demand for tracer compounds that are indicative of the presence of contamination by hydraulic fracturing and do not occur in the subsurface [2].

In this application note, a combination of ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) followed by quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (Q-TOF-MS/MS) was used to detect a bimodal distribution of polyethylene glycols that may be used as indicator compounds for groundwater or surface water impacted by flowback waters. The Kendrick Mass Defect [2,3] was applied in a novel application to differentiate the various adducts of a suite of glycols, in particular, the proton, ammonium, and sodium adducts of each of the chains of glycols. The database of the accurate masses along with their retention times by UHPLC is needed to provide a rapid and accurate analysis of either groundwater or surface water samples using Agilent MassHunter Software.

Experimental

Instruments

Separation of the analytes was carried out using an Agilent 1290 Infinity LC System coupled to an Agilent 6540 Ultra High Definition (UHD) Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system equipped with electrospray Jet Stream Technology. The instrument conditions are shown in Table 1.

Sample collection

The flowback sample was collected on October 14, 2014 and obtained from Weld County, Colorado, with the help of James Rosenblum, University of Colorado, Department of Environmental Sustainability.

Table 1. LC and Q-TOF MS Conditions and Analysis Parameters

LC run conditions	
Column	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8, 4.6 × 150 mm, 3.5 μm
Column temperature	25 °C
Injection volume	10 μL
Mobile phase	A) 0.1% formic acid in water v/v B) Acetonitrile
Linear gradient	10% B for 5 minutes; 10% B to 100% B over 25 minutes
Flow rate	0.6 mL/min
Post run	12 minutes
Q-TOF MS conditions	
Ion mode	ESI, positive
Drying gas	10 L/min
Gas temperature	325 °C
Nebulizer gas	45 psig
Sheath gas	11 L/min at 350 °C
Capillary voltage	4,000 V
Nozzle voltage	1,000 V
Fragmentor voltage	190 V
Skimmer voltage	45 V
Octopole RF	750 V
Mass range	m/z 50–1,000
Detector rate	2 GHz
Resolving power	30,000 at m/z 1,522

Data analysis

The data were processed with Agilent MassHunter Software. Accurate mass measurements of each peak from the total ion chromatograms were obtained by means of an automated calibrant delivery system using a low flow of a calibrating solution (calibrant solution A, Agilent Technologies, Inc.) that contained the internal reference masses purine m/z 121.0509 and HP-921 at m/z 922.0098. The instrument provided a typical mass resolving power of 30,000 at m/z 1522.

Results and Discussion

UHPLC/Q-TOF-MS analysis of hydraulic fracturing waters

The positive ion electrospray total ion current (TIC) chromatogram for the analysis of the flowback water exhibits two distinct zones, or a bimodal distribution (Figure 1). First is a polar series of peaks at a retention time of 4–12 minutes, and second is a less-polar zone that elutes from 12–14 minutes. The series of peaks in both zones are separated by a nominal mass of 44 mass units, which suggest a glycol structure consisting of $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ (Table 2). Furthermore, the accurate mass data in Table 2 show that the differences for the first seven peaks are 44.0266, on the average. A similar result was also observed for the second region between 12–14 minutes in Figure 1 (data not shown). There is an apparent repeatable relationship among the chromatographic peaks, which makes it is possible to apply the Kendrick mass scale [3].

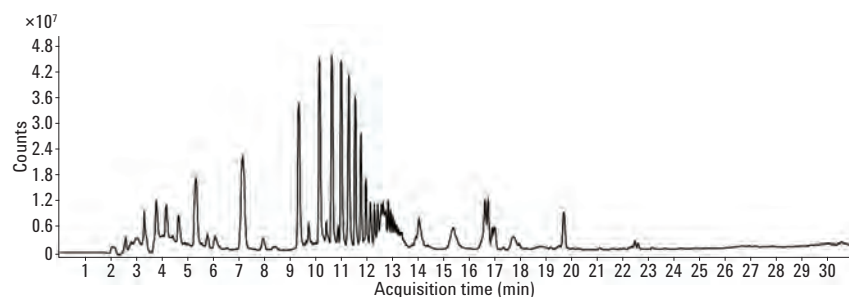


Figure 1. UHPLC/Q-TOF-MS chromatogram of a flowback sample from a recently hydraulic fractured well, which shows a bimodal distribution of polymers that differ by 44.026 mass units, a hydrophilic zone at 4–12 minutes and a second less-polar zone at 12–14 minutes.

Table 2. Kendrick Mass for a Suite of Polyethylene Glycols Found in Flowback Water with an Average Mass Difference of 44.0266*

Retention time (min)	Ion (<i>m/z</i>) measured accurate mass	Kendrick mass	Ion adduct
3.5	173.0776	172.975	Na + PEG-EO-3
4.2	217.1048	216.975	Na + PEG-EO-4
5.4	261.1309	260.975	Na + PEG-EO-5
7.3	305.1586	304.975	Na + PEG-EO-6
9.5	349.1830	348.975	Na + PEG-EO-7
10.2	393.2095	392.975	Na + PEG-EO-8
10.7	437.2373	436.977	Na + PEG-EO-9
10.7	432.2830	432.026	NH ₄ + PEG-EO-9
11.0	476.3067	476.023	NH ₄ + PEG-EO-10
11.3	520.3333	520.023	NH ₄ + PEG-EO-11

*JR-5 sample from Weld County, Colorado, based on a scaling factor of 0.999404559.

Kendrick mass scale

Kendrick used a filtering technique (scaling factor) named after him to better separate and understand a series of hydrocarbons that differed in mass by a methylene group, CH_2 . The Kendrick mass scale has been applied to other series, but only recently to the polyethylene glycol structures and linear alkylethoxylates in flowback and produced waters from hydraulic fracturing by Thurman *et al.* in 2014 [2].

The application of the Kendrick mass scale first involves the determination of the Kendrick mass scaling factor, which is determined as the ratio of the nominal mass of the repeating glycol unit, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})$, divided by the exact calculated mass of the same glycol unit. This is equal to $44/44.026214748$, which gives a scaling factor of 0.999404559. When this scaling factor is multiplied by the measured accurate mass, the resulting mass is called the Kendrick mass [2]. For example, Table 2 shows the Kendrick masses for some of the chromatographic peaks in Figure 1.

The concept of the Kendrick mass defect can then be applied, which is that if two compounds have the same repeating chemical structure, that is, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})$, then there will be an addition of the exact mass of $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ to each new compound in a chromatogram. Thus, when the scaling factor is multiplied by the measured masses, all the ions that differ by the $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ group will have exactly the same mass defect (within the error of accurate mass measurement, which is typically ± 0.001 mass units). These results are shown in Table 2.

For example, Table 2 shows that the measured accurate masses for ions at retention times of 3.5 to 10.7 minutes all had different mass defects ranging from 0.0776 to 0.3333. However, after multiplying by the appropriate Kendrick mass scaling factor for the glycol unit $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-O})$ of 0.999404559, only two mass defects, 0.975 and 0.023, were found for this

suite of 9 ions (Table1). The fact that all of the Kendrick mass defects for each type of ion adduct are nearly identical means that each of the compounds increases by one ethylene glycol unit, or an accurate mass of 44.0262. Thus, it is only necessary to obtain the correct formula and structure for one of the glycols, and then all others can be calculated as either one unit longer or shorter depending on the gain or loss of the 44.0262 mass unit.

Using the measured mass of 305.1586 (a sodium adduct in Table 2), which also shows a proton adduct at m/z 283.1753 in Figure 2, a formula can be determined using MassHunter Software, as shown in Figure 2. The proton adduct at 283.1753 is first highlighted, followed by using the **Generate Formula** option to determine the best formula, shown in Figure 2 as $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_7$, which is the neutral molecular formula.

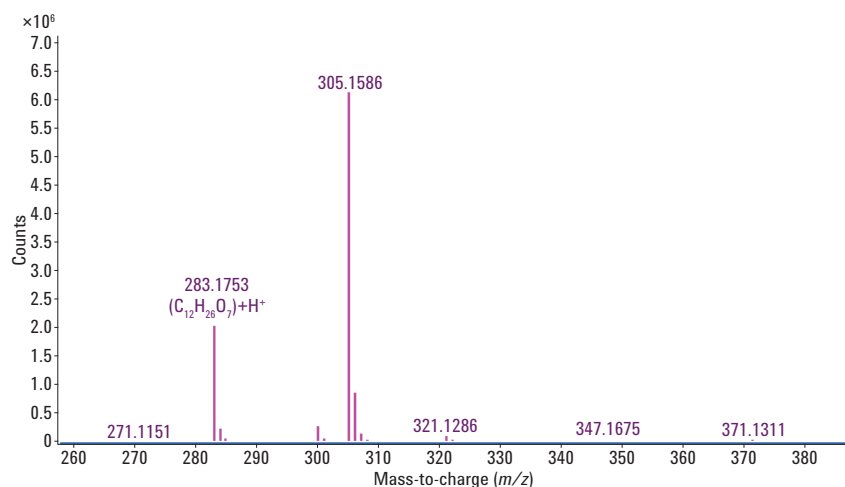


Figure 2. Q-TOF-MS scan from 7.060 to 7.409 minutes, showing the proton adduct at m/z 283.1753 along with the formula generated in Agilent MassHunter Software. The sodium adduct of the ion is also shown at m/z 305.1586.

Analysis by MS/MS of the m/z 283.1753 can determine if the spectrum will match a polyethylene glycol structure, as shown in Figure 3. The mass spectrum consists of a series of 44.026 mass unit losses that translate into a simple PEG structure [4]. The polyethylene glycol unit is equal to $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}$, which means that the chain length of the unit must be $n = 6$, since this length provides the correct formula of $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_7$. Table 2 can then be used to assign PEG-7 and PEG-8 to the higher mass ions, as well as PEGs -3, -4, and -5 to the lower mass ions, since all of the compounds with the same Kendrick mass differ by one glycol unit.

Figure 4 shows the mass spectrum for PEG-9 at a retention time of 10.6 minutes with three major ions at m/z 415.2539, 432.2830, and 437.2378. The mass differences among these three ions are 17 and 22, which indicate that the proton adduct is at 415.2539. What is important to note about the PEG-9 is that the major adduct ion for PEG-9 is no longer the sodium adduct, but rather the ammonium adduct (compare Figures 2 and 4). The mobile phase does not contain ammonium; thus, the ammonium adduct is formed from trace levels of ammonium present in the mobile phase and sample [2]. This shift to the ammonium adduct at PEG-9 has been attributed to a cage-like structure that surrounds the ammonium ion more readily (that is, energetically) and favors the ammonium ion over the sodium ion adduct [2]. The same is true for ammonium adducts of PEG-10 and PEG-11.

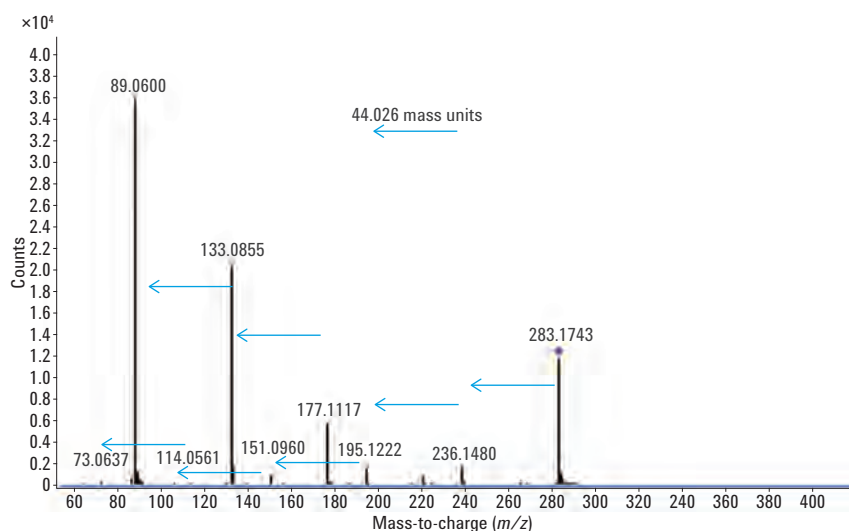


Figure 3. MS/MS spectrum of the m/z 283.1743 proton adduct from Figure 2.

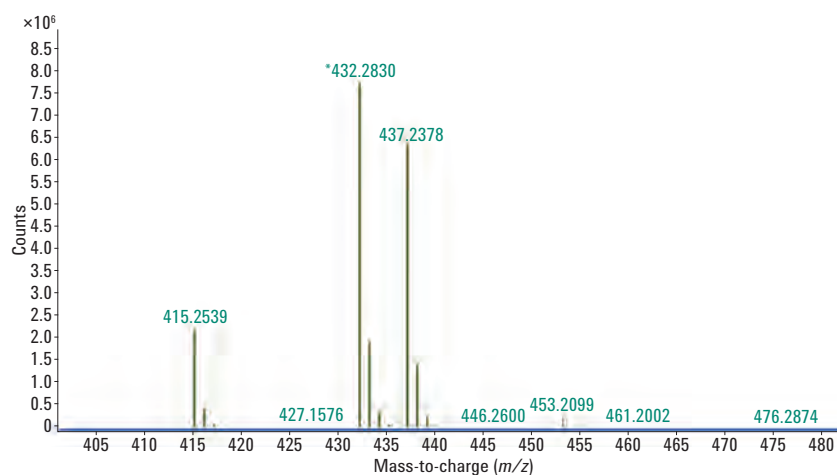


Figure 4. The mass spectrum at 10.6 minutes for PEG-9, with the major ion being the ammonium adduct at m/z 432.2830.

An accurate mass database of PEG compounds

After the application of this Kendrick mass scale, it was possible to identify proton, sodium, and ammonium adducts of the various PEGs shown in Figure 1. These enabled the construction of an accurate mass database of these PEG ions and adducts. It also allowed subsequent use of the MassHunter Software to find the > 40 different PEGs shown in Figure 1, as well as their various ion adducts, in less than 2 minutes of computer time. Identification of these PEGs may enable their use as indicators of contamination of aquifers or surface water by hydraulic fracturing.

Conclusions

The Agilent 1290 Infinity LC System and Agilent 6540 LC/Q-TOF-MS enabled the UHPLC/MS/MS characterization of two sets of representative polyethylene compounds from hydraulic fracturing flowback samples. Applying the Kendrick mass scale to the accurate masses of these PEGs and other ethoxylated surfactants [2] facilitates their identification using Agilent MassHunter Software, and the construction of a database of such compounds present in flowback samples. This database can, in turn, enable the use of these compounds as unique tracers of hydraulic fracturing.

References

1. D. M. Kargbo, R. G. Wilhelm, D. J. Campbell. "Natural gas plays in the Marcellus Shale: Challenges and potential opportunities" *Environ. Sci. Technol.* **44**, 5679-5684 (2010).
2. E. M. Thurman, I. Ferrer, J. Blotvogel, T. Borch. "Analysis of hydraulic fracturing flowback and produced waters using accurate mass: identification of ethoxylated surfactants" *Anal. Chem.* **86**, 9653-9661 (2014).
3. E. Kendrick. "A mass scale based on $\text{CH}_2 = 14.0000$ for high resolution mass spectrometry of organic compounds" *Anal. Chem.* **35**, 2146-2154 (1963).
4. I. Ferrer, E. T. Furlong, E. M. Thurman, in *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, MS/MS and Time-of-Flight MS: Analysis of Emerging Contaminants*, Ferrer, I. Thurman, E. M, Eds.; ACS Symposium Series 850; American Chemical Society: Washington, D.C. pp 376-393.

Acknowledgements

The authors thank James Rosenblum of the University of Colorado for sample collection and for sharing the flowback sample for this application note.

www.agilent.com/chem

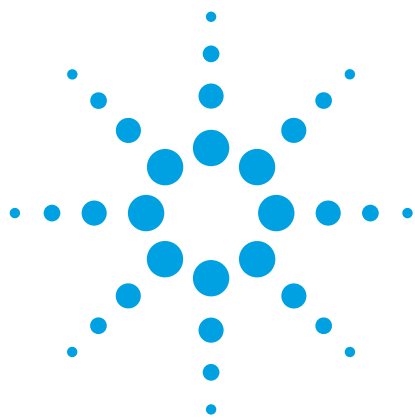
Agilent shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with the furnishing, performance, or use of this material.

Information, descriptions, and specifications in this publication are subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
Printed in the USA
February 18, 2015
5991-5473EN



Agilent Technologies



使用安捷伦 GC/Q-TOF 和精确质量农药谱库对食品中的 740 多种农药残留进行筛查

应用简报

作者

Philip L. Wylie、Joan Stevens
和 Sofia Nieto

摘要

采用 EN QuEChERS 方法对六种有机培植的水果和蔬菜样品进行萃取，并在萃取液中分别加入 10 和 100 ng/mL 浓度的 93 种农药。采用带电子电离源的 Agilent 7200A GC/Q TOF 在高分辨 TOF 模式下对这些加标萃取液进行分析。使用安捷伦 MassHunter 定性分析软件 (B.07.00) 以及全新安捷伦精确质量数 GC/Q-TOF 农药自建化合物数据库和谱库分析数据。分析过程中尝试了两种 GC 方法：

- 利用 Ultimate 吹扫两通相连的一根 5 米的色谱柱与一根 15 米的色谱柱运行 20 min
- 除采用两根 15 米色谱柱运行 40.5 min 外，其他与第一种方法配置相同

两种情形下均在运行结束时对第一根色谱柱进行反吹。当加标浓度为 10 ng/mL 时，20 min 和 40.5 min 的方法能够分别鉴定出 97.3% 和 97.1% 的农药。当加标浓度为 100 ng/mL 时，两种方法则能分别找出 99.6% 和 99.8% 的农药。Q-TOF 能够以优于 2 ppm 的准确度测定分子离子质量数，同时可达到 > 10 的信噪比。



Agilent Technologies

前言

为确保食品供应的安全，各政府机关 [1-3] 和国际食品法典委员会 [4] 均制定了农药最大残留限度 (MRL) 的标准。这些法律规定了用于给定作物的合法农药以及收割后作物上允许残留的最大农药含量。一个国家允许用于某种作物的农药在另一个国家可能不被允许，而且世界各地对各种农药/食品的组合通常具有不同的 MRL 标准。已知世界范围内使用的农药已超过了 900 种，且国际间的食品贸易需求正在不断增加，因此对大量农药的筛查已经迫在眉睫。

典型的农药残留方法采用气相色谱结合串联质谱检测以及液相色谱结合串联质谱检测 (GC/MS/MS [5,6] 和 LC/MS/MS [7])。这些非常灵敏的高选择性方法以目标物采集为基础，因此仅检测方法中包含的农药。最全面的 GC/MS/MS 方法之一包含 375 种目标化合物，其中 349 种化合物是农药 [8]。通常 GC/MS/MS 方法包含更少化合物，因为数百种农药的校准可能既花费不菲又耗时间。

一个无需定期校准的全面方法可对大量农药进行筛查。这一方法可以更有信心地确认样品中不包含任何超出定量方法正常范围以外的农药，因此可作为目标物方法的补充。这种筛查方法无需具备定量能力，但它应具备对多数 10 ng/g (10 ppb) 农药的检测能力——这一浓度通常是未制定允许误差农药的默认可接受 MRL 值。此筛查方法发现的农药随后可被添加到 GC/MS/MS 目标物分析中。

目前正在使用的一个方法是采用 Agilent 7890B 气相色谱结合扫描模式下的 Agilent 5977A 系列 GC/MSD 系统，以及带有农药与内分泌干扰物数据库/谱库的安捷伦解卷积报告软件 (DRS) 对样品进行分析 [9,10]。这是一个成本相对较低的综合性方法，一些农药受到灵敏度的限制，且解卷积有效性在非常复杂的基质中可能会降低。

本应用简报讨论了一个采用 7890 GC 以及 7200 四极杆-飞行时间质谱 (GC/Q-TOF) 系统的新型农药筛查方法。安捷伦 MassHunter 定性分析软件利用个人化合物数据库和谱库 (PCDL) 为每种化合物选择特征精确质量离子，随后对其进行提取以确定它们是否在正确的保留时间 (RT) 处存在以及是否被共洗脱。MassHunter 定性分析软件可创建出三个含有 700 多个条目的农药 PCDL。三个 PCDL 的主要差异在于 GC 方法，因此每个 PCDL 都有对应于所用 GC 方法的锁定保留时间。

实验部分

样品前处理

设备、仪器和材料

- 安捷伦 Bond Elut QuEChERS EN 萃取包，部件号 5982-5650 (安捷伦科技有限公司，Folsom, CA, USA)
- 用于一般水果和蔬菜的安捷伦 Bond Elut QuEChERS EN 分散固相萃取试剂盒，部件号 5982-5056 以及用于高色素的水果和蔬菜的 EN 分散固相萃取试剂盒，部件号 5982-5356
- 安捷伦 Bond Elut QuEChERS 陶瓷均质子，部件号 5982-9311
- Robot Coupe 搅拌机 (Robot Coupe USA, Inc., Ridgeland, MS, USA)
- 2010 Geno Grinder (SPEX 样品前处理，Metuchen, NJ, USA)
- VWR 数字签名多管涡旋振荡器 (VWR, Radnor, PA, USA)
- CentraCLR3R 离心机 (赛默飞世尔，Waltham, MA, USA)

步骤

水果和蔬菜（胡萝卜、西兰花、番茄、青豆、芹菜和红苹果）萃取液的前处理基于采用安捷伦萃取盐和分散试剂盒的快速、简便、经济、高效、耐用和安全的欧洲标准 (EN) 的 (QuEChERS) 方法 [11]。有机培植的水果和蔬菜被切碎、冷冻，随后在 Robot Coupe 搅拌机中利用干冰进行匀浆。然后将均质样品储存于 -20°C 下等待萃取。

萃取/分离

称取 10 克均质样品至 50 mL 离心管中，并加入两粒陶瓷均质子。向样品管中加入 10 mL 乙腈，盖好并涡旋振荡 1 min。将含有 4 g MgSO_4 、1 g NaCl、1 g 柠檬酸钠和 0.5 g 柠檬酸二钠盐的一包安捷伦 EN QuEChERS 萃取盐（部件号 5982-5650）直接加入试管中。将样品管盖紧，并在 Geno Grinder 中剧烈振摇 1 min。随后将样品离心管以 5000 rpm 的转速离心 5 min。

分散式固相萃取净化

从萃取液中吸取 6 mL 乙腈上清液，转移至 15 mL 安捷伦 QuEChERS EN 分散式 SPE 管中。对于胡萝卜、番茄、芹菜和红苹果萃取液，使用含有 150 mg PSA 和 900 mg MgSO_4 的 QuEChERS EN 分散式固相萃取试剂盒（部件号 5982-5056）。对于西兰花和青豆萃取液，使用含有 150 mg PSA、45 mg GCB 和 855 mg MgSO_4 的 QuEChERS EN 分散固相萃取试剂盒（部件号 5982-5356）。将管盖紧，涡旋振荡 1 min，然后以 5000 rpm 的速率离心 5 min。

混标萃取液

浓度为 100 ppm ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$) 的九种不同定制农药标准品购自 AccuStandard (New Haven, CT)。从九个样品瓶中各取 100 μL 混合，并额外添加 100 μL 乙腈，最终配制成稀释比为 1:10 的混标 ($10\text{ }\mu\text{g/mL}$)。10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液按 1:10 稀释后成为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混标。将 1 μL 的 10 $\mu\text{g/mL}$ 混标加入 99 μL 水果或蔬菜萃取液中制备成浓度为 100 ng/mL 的加标溶液。将 1 μL 的 1 $\mu\text{g/mL}$ 混标加入 99 μL 水果或蔬菜萃取液中制备成浓度为 10 ng/mL 的加标溶液。

图 1 展示了 QuEChERS 样品萃取步骤的工作流程。

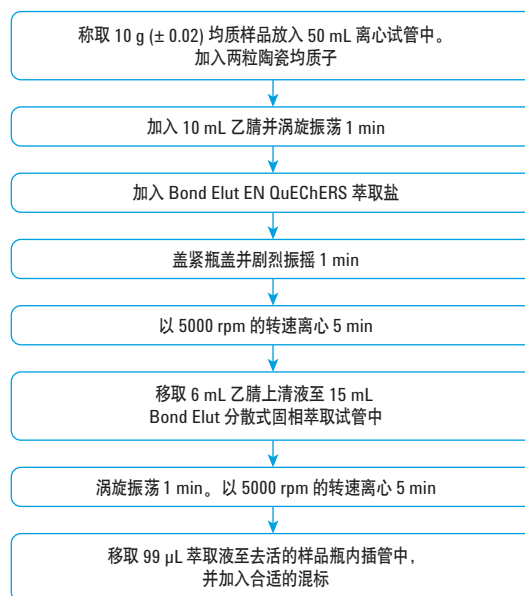


图 1. 安捷伦 QuEChERS 样品萃取步骤流程图

仪器和分析条件

仪器和分析条件列于表 1 和表 2 中。实验采用两种柱中反吹方法，每种方法都具有各自的 GC 色谱柱配置、总运行时间和分析物保留时间。第一种方法使用了两根色谱柱：第一根色谱柱（5 m × 0.25 mm, 0.25 μm DB-5）连接在多模式进样口 (MMI) 与一个吹

表 1. 采用 5×15 方法的仪器与条件

参数	数值
气相色谱	Agilent 7890B 气相色谱，带 240 V 电源
自动进样器	Agilent 7693A 系列自动液体进样器和样品盘
进样量	2 μL 冷不分流
进样速度	快速
进样口衬管	2 mm 内径超高惰性浅凹坑衬管（部件号 5190-2296）
隔垫吹扫流量和模式	3 mL/min，切换
色谱柱 1	Agilent DB-5, 5 m × 0.25 mm, 0.25 μm，安装在 MMI 与吹扫三通之间（由 15 m 色谱柱（部件号 122-5012）切割而来）
色谱柱 2	Agilent DB-5, 15 m × 0.25 mm, 0.25 μm（部件号 122-5012），安装在吹扫三通与 Q-TOF 之间
色谱柱 1 流量	氮气，理论为 1.0 mL/min
色谱柱 2 流量	氮气，理论为 1.1 mL/min（柱 1 流量 + 0.1 mL/min）
反吹（运行后）	290 °C 下运行 3 min 柱 1 流量 = -36.852 mL/min 柱 2 流量 = 12.672 mL/min
保留时间锁定	甲基毒死蜱，锁定在 8.524 min 处
MMI 温度程序	在 60 °C 下保持 0.02 min，以 600 °C/min 升温至 300 °C，保持
MMI 模式	不分流 （1.5 min 时到分流出口的吹扫流量 = 100 mL/min） 载气节省流速 20 mL/min，2.0 min 时开启
柱温程序	在 60 °C 下保持 1.5 min，以 50 °C/min 升温至 160 °C (0 min)，以 8 °C/min 升温至 240 °C (0 min)，以 50 °C/min 升温至 280 °C (2.5 min)，以 100 °C/min 升温至 290 °C (3.1 min)
质谱仪	Agilent 7200A Q-TOF
质谱模式	EI；仅在高分辨率 (4 GHz) 模式下采用 TOF
碰撞气体	氮气，在 1.5 mL/min 时开启
储存质量范围	m/z 35–550
采集速率	5 Hz
传输线温度	300 °C
离子源和四极杆温度	300 °C 和 180 °C

扫三通之间，第二根色谱柱（15 m × 0.25 mm, 0.25 μm DB-5）连接在吹扫三通与 Q-TOF 传输线之间（图 2）。第二种方法以同样的方式配置色谱柱，但使用的是两根 15 m × 0.25 mm, 0.25 μm 色谱柱。这些配置被称为 5×15 方法和 15×15 方法，均在恒流模式下运行，且运行时间分别为 20 min 和 40.5 min。

表 2. 15×15 方法的色谱柱和条件

参数	数值
色谱柱 1 和 2	Agilent DB-5, 15 m × 0.25 mm, 0.25 μm（部件号 122-5012），安装方式如表 1 所示
色谱柱 1 流量	氮气，理论为 1.5 mL/min
色谱柱 2 流量	氮气，理论为 1.7 mL/min（柱 1 流量 + 0.2 mL/min）
反吹（运行后）	310 °C 保持 5 min 柱 1 流量 = -11.536 mL/min 柱 2 流量 = 11.95 mL/min
保留时间锁定	甲基毒死蜱，锁定在 18.111 min 处
柱温箱升温程序	60 °C 下保持 1 min，以 40 °C/min 升温至 120 °C (0 min) 以 5 °C/min 升温至 310 °C (0 min)

此处未显示的仪器和条件与表 1 中所示的相同

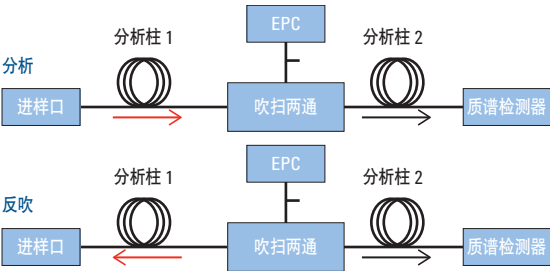


图 2. 运行结束时反吹色谱柱 1 的气相色谱柱配置。在 5×15 方法中，柱 1 长 5 m，柱 2 长 15 m；而在 15×15 方法中，两根色谱柱长度均为 15 m。在反吹过程中，吹扫三通处的压力增大与进样口压力的减小导致柱 1 中的流量方向颠倒。被保留的化合物随色谱柱液流从进样口的分流出口排出

气相色谱柱

应采用 DB-5 色谱柱进行以上分析。5 m × 0.25 mm, 0.25 μm 的色谱柱由 15 m 色谱柱切割而来。这些 DB-5 色谱柱具有与用于创建农药 PCDL 的安捷伦 HP-5MS UI 色谱柱几乎相同的保留时间。请注意，由于 DB 5MS 色谱柱具有不同的固定相，因此无法提供相同的保留时间。

采集和数据分析软件

MassHunter GC/MS 采集软件 (B.07.00 SP2 版) 用于进行仪器控制和数据采集。MassHunter 定性分析软件 (定性, B.07.00 版) 用于进行数据分析。特别地, 定性软件按分子式查找部分中内置的全离子工作流程可用于确定待分析农药是否能在多种基质中被 GC/Q-TOF 方法鉴定出来。数据分析以轮廓质谱图形式进行。

Q-TOF 调谐

实验对所有分析均采用 4 GHz 的 EI 自动调谐。离子源和四极杆温度分别设置为 300 °C 和 180 °C。作为样品序列的一部分, TOF 质量分配在分析每个样品之前立即被自动校准。TOF 质量数校准自动进行, 每次运行耗时约 90 s。

结果与讨论

此处讨论的数据分析方法仅针对定性分析。方法目的是鉴定农药污染物, 而非对其进行定量。一位分析人员可以对一组目标化合物进行校准, 但使每位人员对 PCDL 中的 700 多种农药进行校准显然不切实际。对于这种方法应假设 GC/Q-TOF 方法用于筛查, 且发现的任何农药均可添加到 GC/MS/MS 目标化合物方法中。

水果和蔬菜萃取液中加入的标准液浓度为 10 ng/mL, 这一浓度通常是农药/商品组合中不存在农药时的约定默认 MRL。进行筛查时无需对这一浓度进行定量, 仅需要证明农药有可能存在即可。对于未制定 MRL 的农药, 浓度通常比 10 ng/mL 高很多。因此, 样品也应添加 100 ng/mL 浓度的标准品。这样就可以对比两个相应农药浓度下的全离子方法性能。加标 QuEChERS 的萃取液色谱图如图 3 所示。QuEChERS 萃取通常为 GC/MS/MS 农药残留分析提供恰到好处的净化。因此, 基质响应一般比目标农药的响应高出多个数量级, 且在基质存在时需要极高选择性以对分析物进行检测。本研究的目的之一即是确定结合高分辨率精确质量数 (HRAM) TOF 检测的 GC 是否能为低浓度筛查提供足够的选择性。

反吹配置

如图 3 所示, 萃取液中含有高浓度的共萃取内源性化合物。通常, 每次运行结束后气相色谱柱需要在高温下烘烤以确保其洁净度可用于下次分析 [5]。然而, 第一根色谱柱保留的弱挥发性化合物能够在运行结束时通过增大吹扫两通压力并减小进样口压力来反吹色谱柱 (图 2)。对于 5×15 方法, 柱 1 在 290 °C 下以 -36.9 mL/min 左右的流速被反吹 3 或 4 min; 对于 15×15 方法, 柱 1 在 310 °C 下以 -11.5 mL/min 左右的流速被反吹 5 min。以上反吹时间比通常所需的时间长 1 或 2 min, 因为这类方法也用于分析黑胡椒萃取液等众所周知的难分析样品。

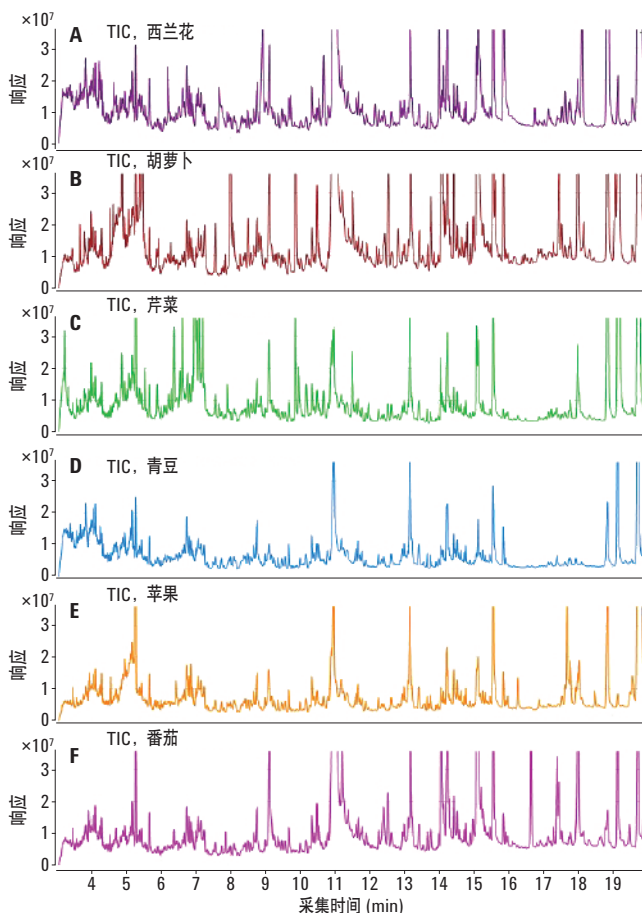


图 3. 加入 100 ng/mL 表 3 中描述的农药标准品的 QuEChERS 萃取液色谱图。A) 西兰花、B) 胡萝卜、C) 芹菜、D) 青豆、E) 红苹果和 F) 番茄。所有色谱图均采用相同量程并已沿 Y 轴放大, 以显示每种萃取液的固有复杂性

全离子筛查过程

从 PCDL 中选择的精确质量离子提取自分析物已知保留时间处的色谱图。青豆萃取液中喹氧灵的叠加提取离子色谱图 (EIC) 如图 4C 所示。软件选择一个 EIC 作为参比离子, 并确定其他所选离子的峰形和保留时间是否与参比离子相匹配。在对峰的每次质谱采集, 将每个离子的响应与相应参比离子的响应进行对比。理想情况下, 所有色谱峰中这一比值将保持一致。将这些比值归一化后作图, 结果如图 4D 所示。如果离子色谱的形状和保留时间都非常完美, 图 4D 中的图形将会是一条位于 1 的水平直线。

如果目标化合物具有一个可测定的分子离子, 图 4E 中绘制了其同位素模式以及以红色方框显示的理论离子比例和间隔。图 4B 中

的窗口展示了哪些离子是合格的 (共洗脱得分高于用户设定的要求)。上方的标题栏中显示了化合物名称、分子式、分子离子的 m/z 、 $M+^+$ 测定质量数与理论质量数的偏差 (以 ppm 为单位) 以及数据库保留时间与实际保留时间之间的偏差。图 4F 中的顶部窗口显示了提取离子和分子离子同位素 (如果存在), 而下方的窗口显示了所提取峰的平均总离子流色谱图 (TIC)。图 4A 中的表格总结了鉴定出的每个化合物的所有信息。

TOF 常常采集全谱, 因此采集完成很久以后都可以对数据进行回顾与重新分析。数据采集与 PCDL 中的化合物数目无关, 因此理论上来说, 所有化合物都能添加到 PCDL 以扩展筛查方法的范围。

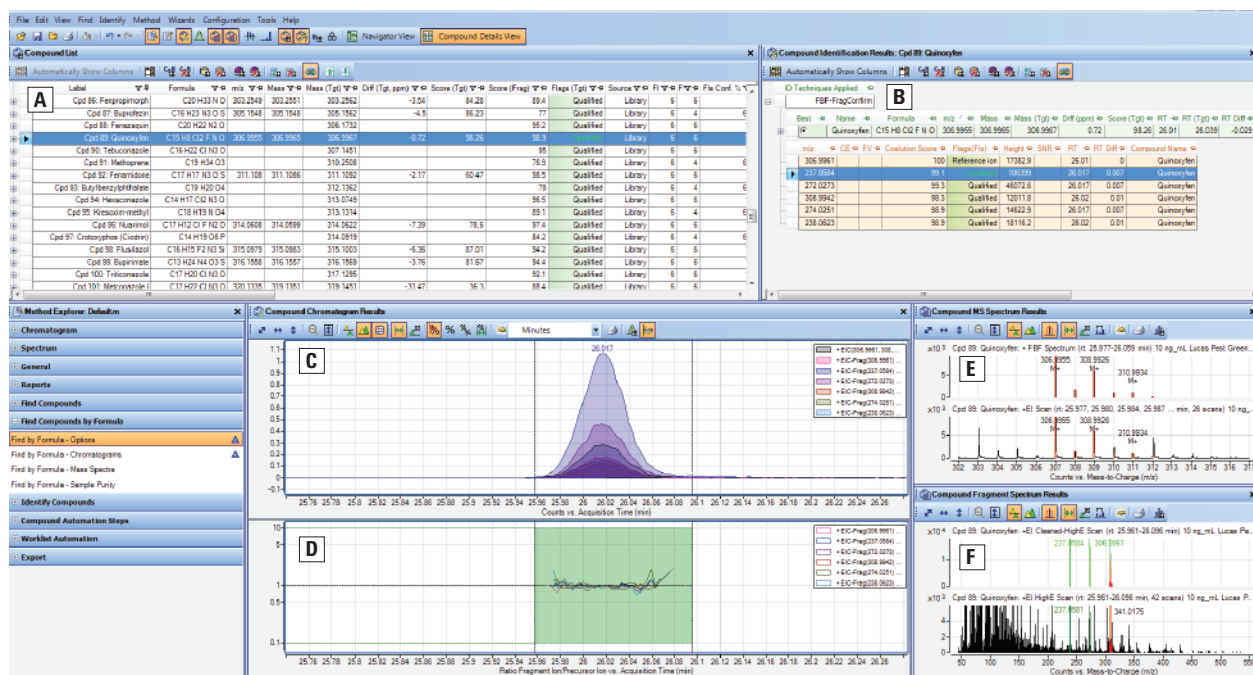


图 4. 青豆萃取液中突出显示喹氧灵的农药分析结果。A) 化合物列表显示条目、B) 喹氧灵的化合物鉴定结果、C) 最有意义喹氧灵离子的提取离子色谱图、D) 共洗脱图、E) 分子离子同位素比例图和 F) 提取离子 (上图) 和色谱峰中的平均 TIC (下图)

图 5 展示了胡萝卜萃取液中鉴定出的 10 ng/mL 姜锈灵的另一个示例。六幅 EIC 图表现出良好的峰形和保留时间的一致性 (图 5A)，这可以得到图 5B 显示的高共洗脱得分的支持。此外，分子离子的测定质量数与计算所得的同位素质量数仅相差 1.1 ppm。

而且，姜锈灵的测定保留时间与 5x15 数据库中的值仅相差 0.013 min (0.78 s)。从谱库质谱图 (图 5C) 中可以看出，虽然六个提取离子中的三个相对较弱，但仍旧可被发现。

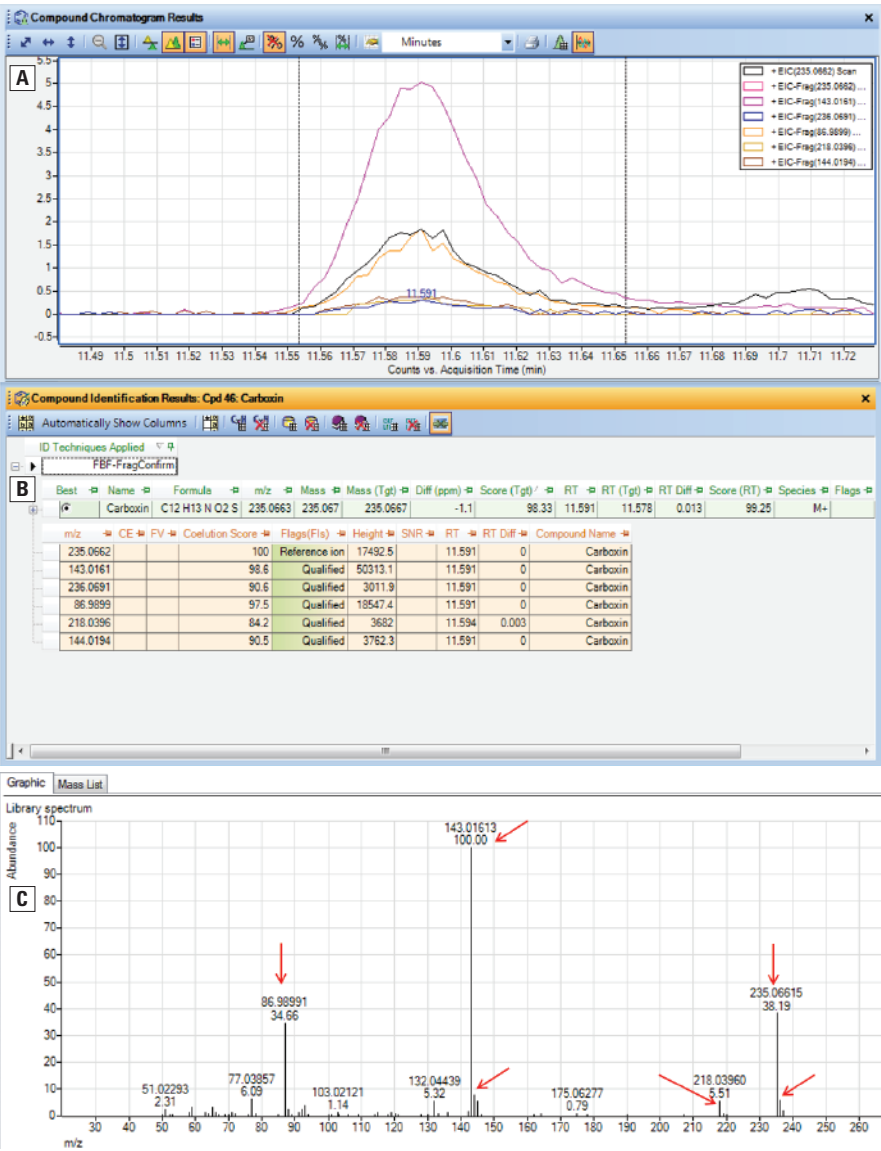


图 5. 胡萝卜萃取液中 10 ppb 的姜锈灵。A) 显示参比离子和姜锈灵其他五个特征离子的 EIC；B) 表明所有六个离子均被找到的化合物鉴定结果。M⁺ 的质量准确度和保留时间准确度显示于化合物名称的右侧；C) 显示用于识别的六个离子的姜锈灵 PCDL 质谱图

加标水果和蔬菜的结果

表 3 和表 4 分别总结了 5×15 20 min 方法和 15×15 40 min 方法两种不同 GC/Q-TOF 方法所获得的结果。表 3 中列出的所有农药都包含在采用 5×15 方法的安捷伦气相色谱 HRAM 农药 PCDL 中。其中有七种农药目前并不包含在 15×15 PCDL 中，也不在表 4 中。总体来说，5×15 方法确定了 93 种目标农药，15×15 方法则确定了 86 种目标农药。此处列出的所有农药的锁定保留时间和精确质量谱图都能在安捷伦 GC/Q-TOF 农药 PCDL（部件号 G3892AA）中找到。

表 3 还列出了用于每种农药的最佳分析方法。列出的所有农药均适用于 LC/MS 分析，虽然其中一些农药在最佳情况下能用 GC/MS 分析，但 LC/MS 仍是首选方法。多数化合物可由两种技术中的任意一种进行分析。

使用 5×15 方法可在六种萃取液中鉴定出平均 97.3%（加标 10 ng/mL）和 99.6%（加标 100 ng/mL）的农药。15×15 方法将耗费两倍的运行时间（40.5 min 相比 5×15 方法的 20 min），如此有可能实现更好的分离，从而实现更多农药的鉴定。但结果几乎相同：加标 10 ng/mL 时鉴定出 97.1% 的化合物，而加标 100 ng/mL 时则鉴定出 99.8 % 的化合物。这些结果总结于表 3 和表 4 的底部。

表 3. 采用 5x15 GC/Q-TOF 方法和 5x15 GC/Q-TOF 农药 PCDL 鉴定出的加标浓度为 10 和 100 ppb 的水果和蔬菜萃取液中的农药（接下页）
（93 种农药中）发现的农药数量及其百分比总结于表格底部

采用 5×15 方法分析的农药	首选分析方法	青豆		番茄		胡萝卜		红苹果		芹菜		西兰花	
		10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
1-萘酚	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯并噻二唑	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
莠灭净	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噁菌酯	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯霜灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉酰菌胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
糠菌唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙噁酚磺酸酯	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噻嗪酮	G 或 L	X	X	X	X		X	X	X		X	X	X
萎锈灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
唑草酮	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
烯草酮	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环莠隆	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
噁菌环胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苄氯三唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙霉威	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯醚甲环唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乐果	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
烯酰吗啉	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
烯唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

X = 鉴定出的农药
M = 鉴定出的代谢物
G = GC/MS
L = LC/MS

表 3. 采用 5x15 GC/Q-TOF 方法和 5x15 GC/Q-TOF 农药 PCDL 鉴定出的加标浓度为 10 和 100 ppb 的水果和蔬菜萃取液中的农药 (接下页)

采用 5×15 方法分析 的农药	首选 分析方法	青豆		番茄		胡萝卜		红苹果		芹菜		西兰花	
		10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
敌草隆	L	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
氟环唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙环唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甜菜味	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙螨唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噁唑菌酮	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噁唑菌酮	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氯苯嘧啶醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
喹螨醚	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
腈苯唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环酰菌胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯氧威	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
丁苯吗啉	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟虫腈	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
咯菌腈	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟噻草胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟啶菌酯	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟唑唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟硅唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
粉唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
呋霜灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
呋线威	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
己唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抑霉唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
种菌唑	G 或 L		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
异噁唑草酮	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
醚菌酯	G 或 L	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X
氯酚奴隆	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	
苯噻草胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
啉菌胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
灭锈胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甲霜灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
叶菌唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
盖草津	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
溴谷隆	G 或 L		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噻草酮	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
自克威	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

X = 鉴定出的农药
M = 鉴定出的代谢物
G = GC/MS
L = LC/MS

表 3. 采用 5x15 GC/Q-TOF 方法和 5x15 GC/Q-TOF 农药 PCDL 鉴定出的加标浓度为 10 和 100 ppb 的水果和蔬菜萃取液中的农药 (接下页)

采用 5×15 方法分析的农药	首选分析方法	青豆		番茄		胡萝卜		红苹果		芹菜		西兰花	
		10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
腈菌唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
双苯氟脲	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟苯嘧啶醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
邻苯基苯酚	G 或 L	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
邻苯基苯酚	G 或 L	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
多效唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
戊菌唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉氧菌酯	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
增效醚	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抗蚜威	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
咪鲜胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
扑灭通	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
扑草净	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
克螨特	G	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
丙环唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
比锈灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
吡蚜灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉霉胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
吡丙醚	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉氧灵	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
密草通	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
螺螨酯	G 或 L	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
螺甲螨酯	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
螺环菌胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甲磺草胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
戊唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
吡蚜胺	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
特丁通	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
去草净	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟醚唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噻虫嗪	L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
三唑酮	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
三唑醇	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
肟菌酯	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
灭菌唑	G 或 L	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5x15 20 min 方法发现的 (93 种农药中的) 农药数量		91	93	90	93	91	93	93	93	88	92	90	92
5x15 方法发现的农药百分比		97.8	100	96.7	100	97.8	100	100	100	94.6	98.9	96.7	98.9

X = 鉴定出的农药
M = 鉴定出的代谢物
G = GC/MS
L = LC/MS

表 4. 采用 15x15 GC/Q-TOF 方法和 15x15 农药 PCDL 鉴定出的加标浓度为 10 和 100 ppb 的水果和蔬菜萃取液中的农药（接下页）

（86 种农药中）发现的农药数量及其百分比总结于表格底部

采用 15×15 方法分析的农药	青豆		番茄		胡萝卜		红苹果		芹菜		西兰花	
	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
1-萘酚	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯并噻二唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
莠灭净	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉菌酯	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯霜灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉酰菌胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
糠菌唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙啉磺酸酯	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噻嗪酮	X	X		X		X		X	X	X	X	X
萎锈灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
唑草酮	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环莠隆	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉菌环胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
吡氯三唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙霉威	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯醚甲环唑		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
乐果	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
烯酰吗啉	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
烯唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
敌草隆	M	M	M	M	M	M	M	M		M	M	M
乙环唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甜菜呋	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
乙螨唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噁唑菌酮	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
咪唑菌酮	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氯苯嘧啶醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉啉醚	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环酰菌胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
环酰菌胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
丁苯吗啉	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟虫腈	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
咯菌腈	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟噻草胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟唑啉	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟硅唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
粉唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
呋霜灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

X = 鉴定出的农药

M = 鉴定出的代谢物

表 4. 采用 15x15 GC/Q-TOF 方法和 15x15 农药 PCDL 鉴定出的加标浓度为 10 和 100 ppb 的水果和蔬菜萃取液中的农药（接下页）

采用 15×15 方法分析的农药	青豆		番茄		胡萝卜		红苹果		芹菜		西兰花	
	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
呋线威	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
己唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抑霉唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
种菌唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
异丙威	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
醚菌酯	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
苯噻草胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉菌胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
灭锈胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甲霜灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
叶菌唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
盖草津	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
溴谷隆	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
噻草酮	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
自克威	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
腈菌唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟苯啉啶醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
邻苯基苯酚	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
恶霜灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
多效唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
戊菌唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉氧菌酯	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
增效醚	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
抗蚜威	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
咪鲜胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
扑灭通	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
扑草净	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
克螨特		X		X			X	X		X		X
丙环唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
比锈灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
哒螨灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉霉胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
吡丙醚	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
啉氧灵	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
密草通	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
螺螨酯	X	X		X	X	X	X	X	X	X		X
螺甲螨酯	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
螺环菌胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
甲磺草胺	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X

X = 鉴定出的农药

M = 鉴定出的代谢物

表 4. 采用 40.5 min 15x15 GC/Q-TOF 方法和 15x15 农药 PCDL 鉴定出的加标浓度为 10 和 100 ppb 的水果和蔬菜萃取液中的农药 (承上页)

采用 15×15 方法分析的农药	青豆		番茄		胡萝卜		红苹果		芹菜		西兰花	
	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
戊唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
吡蚜胺	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
特丁通	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
去草净	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
氟醚唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
三唑酮	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
三唑醇	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
肟菌酯	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
灭菌唑	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15×15 40 min 方法发现的 (86 种农药中的) 农药数量	84	86	83	86	84	85	85	86	81	86	84	86
15x15 方法发现的农药百分比	97.7	100	96.5	100	97.7	98.8	98.8	100	94.2	100	97.7	100

X = 鉴定出的农药
M = 鉴定出的代谢物

在这一筛查方法中，使用 70 eV 电子电离 (EI) 源具有若干优势。EI 提供了丰富的诊断离子，提高了鉴定可信度。TOF MS 生成的标准 EI 质谱可重现并可采用谱库检索。这意味着数据文件也可以使用安捷伦 MassHunter 未知物分析软件进行评估。此软件首先将色谱图解卷积，然后通过应用标准质谱库检索来鉴定组分。事实上，精确质量农药 PCDL 也能像 NIST 中的某个市售标称质谱库一样用于这一目的。对某个化合物进行初步鉴定后，MassHunter 定性软件可为质谱图上的精确质量碎片分配分子式以检验是否与所分配的结构一致。

质量精度

TOF 的质量精度取决于所测定离子的丰度、质量分配校准的准确度以及其他一些因素。如果因信号过小而无法得到良好的离子统计数据或因信号过大而使检测器接近饱和，则会产生质量分配的偏移。为说明 Agilent 7200 GC/Q TOF 准确测定 m/z 的能力，实验测定了西兰花萃取液（加标 100 ng/mL）中农药分子离子（若存在）的信噪比 (S/N)。在分子离子信号较弱 (S/N < 10) 的情况下，测定 m/z 值与计算所得的单一同位素质量的平均偏差是

5.69 ppm (表 5)。当 S/N 介于 10 与 100 之间时，质量精度优于 2 ppm；而当 S/N 超过 100 时，质量精度则为 1.25 ppm。这些结果均是在样品分析前立即对 TOF 质量分配进行自动校准时获得的。您也可以在运行中使用内部参比质量进行连续质量调整，但本实验并未采用这种方式。

表 5. 作为提取离子色谱图中该离子信噪比函数的 (质谱图显示一个峰的农药的) 分子离子质量精度

M ⁺ 在范围内的农药数量	信噪比范围	平均质量数误差 (ppm) ^a
10	< 10	5.69
34	> 10 但 < 100	1.92
27 ^b	> 100	1.25

^a 平均质量误差绝对值
^b 去除具有饱和分子离子的离群值之后
测定加标浓度为 100 ng/mL 的西兰花萃取液，并采用 5×15 方法进行分析

结论

Agilent 7200 GC/Q-TOF 可用于对加标 10 ng/mL 和 100 ng/mL 两个不同浓度的 93 种农药的六种水果和蔬菜样品的 QuEChERS 萃取液进行筛查。实验采用配备全离子工作流程的安捷伦 MassHunter 定性分析软件 (B.07.00) 结合全新安捷伦 GC/Q-TOF 农药 PCDL 执行筛查程序。将采用 5×15 柱中反吹配置的 20 min GC 方法与采用 15×15 柱中反吹配置的 40 min 方法对比, 以检验更长的运行时间是否能实现更多农药的鉴定。两种方法通过 MassHunter 全离子方式鉴定出的农药数量几乎没有差异。在加标浓度为 10 ng/mL 时, 两种方法可鉴定出 97 % 以上的农药; 在加标浓度为 100 ng/mL 时, 则可鉴定出 99 % 以上的农药。当分子离子的 S/N > 10 时, TOF 的质量精度优于 2 ppm。由于 TOF 采集了所有时间内的全谱图, 因此可以进行回顾性数据分析。

参考文献

1. "Indexes to Part 180 Tolerance Information for Pesticide Chemicals in Food and Feed Commodities," US EPA, <http://www.epa.gov/opp00001/regulating/part-180.html>
2. "Maximum Residue Levels," European Commission, http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/index_en.htm
3. "Pesticide Maximum Residue Limit (MRL) legislation around the world," New Zealand Ministry of Primary Industries, <http://www.foodsafety.govt.nz/industry/sectors/plant-products/pesticide-mrl/worldwide.htm>
4. "CODEX Pesticides Residues in Food Online Database," Codex Alimentarius, FAO/WHO Food Standards, <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>
5. K. Mastovska, P. L. Wylie. "Evaluation of a New Column Backflushing Set-up in the Gas Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Analysis of Pesticide Residues in Dietary Supplements" *J. Chromatogr. A*, **1265** 155–164 (2012)
6. K. Mastovska, Rugged GC/MS/MS Pesticide Residue Analysis Fulfilling the USDA Pesticide Data Program (PDP) Requirements (满足 USDA 农药数据项目 (PDP) 要求的稳定 GC/MS/MS 农药残留分析方法), 安捷伦科技公司, 出版号 5991-1054EN
7. Y. Chen, *et al.* "Multiresidue Pesticide Analysis of Dried Botanical Dietary Supplements Using an Automated Dispersive SPE Cleanup for QuEChERS and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, **60** (40), 9991–9999 (2012)
8. K. Banerjee, *et al.* "Multiresidue determination of 375 organic contaminants including pesticides, polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in fruits and vegetables by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry with introduction of semi-quantification approach," *J. Chromatogr. A*, **1270**, 283–295 (2012)
9. G. Satpathya, Y. K. Tyagia, R. K. Gupta. "A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE)–dispersive solid-phase extraction (d-SPE)–retention time locked (RTL)–gas chromatography–mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS)" *Food Chemistry*, **127**(3), 1300-1308 (2011)
10. M. Mezcuca, *et al.* "Simultaneous Screening and Target Analytical Approach by Gas Chromatography-Quadrupole-Mass Spectrometry for Pesticide Residues in Fruits and Vegetables," *J. AOAC Int.*, **92**(6), 1790-1806 (2009)
11. EN 15662: "Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method."

更多信息

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。

www.agilent.com

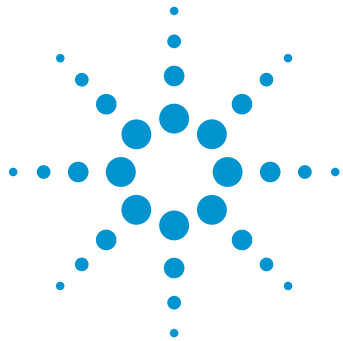
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

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, 2015
2015 年 4 月 10 日, 中国出版
5991-5633CHCN



Agilent Technologies



使用 Q-TOF LC/MS 和 Mass Profiler 软件对河水进行环境分析

应用简报

环境

作者

Christian Zwiener 博士
图宾根大学
Tübingen, Germany

Tiffany Payne
安捷伦科技有限公司
Santa Clara, California

摘要

为满足对环境中新污染物的检测和鉴定需求，要求采用一种全新的环境筛查方法，该方法采用精确质量数 LC/MS 进行分析并通过统计软件包进行严格的数据分析。该方法使用配备 Agilent MassHunter Profiler 软件的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统研究从水处理厂上游与下游采集的河水样品。如果污染物存在于下游而不存在于上游，则表明发生了污染。从下游水样数据中提取出这些污染物的数据，并将其提交至精确质量数据库和谱库中以进行鉴定。最终在下游样品中检出了 890 种化合物，并对其中的 21 种实现了成功鉴定。

前言

环境中的新兴污染物引起了世界许多地区的环境科学家和公众越来越多的关注。农药、除草剂、药物、防腐剂和阻燃剂是能够对地表水、地下水和饮用水水质构成威胁的污染物。它们也会对水生生态系统和公众健康产生不利影响^{1,2}。此外，水样中不足 0.1% 的细胞氧化应激可能与已知污染物的影响有关³。这清楚地表明了对更深入筛查方法的需求。

环境中已知污染物的质谱检测和定量分析方法已发展完善并为人熟知，但这些技术无法对未知污染物进行检测。因此，本研究中采用高分辨率质谱和化学计量（统计）分析开发出用于完全非靶向方法的新工具和技术。



Agilent Technologies

整套方法使用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统、Agilent Mass Profiler 软件和 Agilent MassHunter 定性分析软件分析、提取并鉴定河水样品中的未知污染物。

实验部分

水样采自德国阿默河，采样点位于某污水处理厂的上游和下游。使用固相萃取 (HLB 和 ENBV+) 进行富集，预浓缩因子为 500。

采用 Agilent 1260 Infinity HPLC 系统进行分离，该系统包括 Agilent 1260 Infinity 二元泵 (G4220A)、Agilent 1260 Infinity 高性能自动进样器 (G4226A) 和 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316C)。

采用 B.05.01 版 MassHunter 数据采集软件在 2 GHz 的扩展动态范围模式下操作 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF，MS 模式下的采集速率为 1 次扫描/秒，而 MS/MS 模式下的采集速率为 3 次扫描/秒，对靶向 MS/MS 目标物列表采用基于质量数的碰撞能量设置。

实验参数

UHPLC 色谱柱	Phenomenex Synergi Polar-RP 色谱柱, 150 × 3 mm, 4 μm, 35 °C	
流动相	A) 水 + 0.1% 甲酸 B) 甲醇 + 0.1% 甲酸	
梯度程序	Min	% B
	0	5
	1	5
	10	95
	17	95
停止时间	17 min	
流速	0.3 mL/min	

结果与讨论

在 B.06.00 版 MassHunter 定性分析软件中使用分子特征提取器 (MFE) 算法对数据进行分析。MFE 链接源于特定目标分子的质谱数据，并将结果编入色谱图中。在提取到特定样品中的分子 (特征) 后，数据将被提交至 Mass Profiler (MP) 进行统计分析。

从污水处理厂下游采集的水样经重复提取三次后检测到了 1564 个特征。大多数特征均为下游样品所特有 (1043 个特征)，揭示了污水处理厂出水对地表水水质的重大影响。数据简化包括保留时间和质量数据的校准、空白扣除以及在所有三次重复分析中的出现率。对归属于污水出水的剩余 1043 个特征进行进一步检验以鉴定可能的污染物。分子式生成器 (MFG) 软件利用目标特征的精确质量数计算并得出分子式，并使用源自同位素模式、同位素间隔以及所分配分子式的理论精确质量数与所采集特征的精确质量数之

间差值的得分来评价目标特征精确质量数的准确度。例如，根据质量数差异 94.5、同位素模式 99.7 和同位素间隔 99.4 的综合得分，得到 $C_{16}H_{25}NO_2$ 于 m/z 264.1967 的得分为 97.1。使用元素 C、H、N、O、S、P 和 Cl 在 5 ppm 的质量准确度下，总共为所测量的精确质量数分配了 894 个总化学式。

通过在数据库中搜索总化学式对下游水样中的显著特征进行初步鉴定，采用包含 450 多种水生环境相关污染物的自制数据库得到了 18 个匹配结果，采用安捷伦法医毒理学个人化合物数据库得到了 144 个匹配结果，而采用安捷伦农药个人化合物数据库得到了 26 个匹配结果。选择相关化合物进行进一步研究和鉴定。在后续 Q-TOF LC/MS 测量中将这此化合物编入化合物列表，其中母离子将自动转移至 MS/MS 分析列表 (MS/MS 目标物列表) 中。

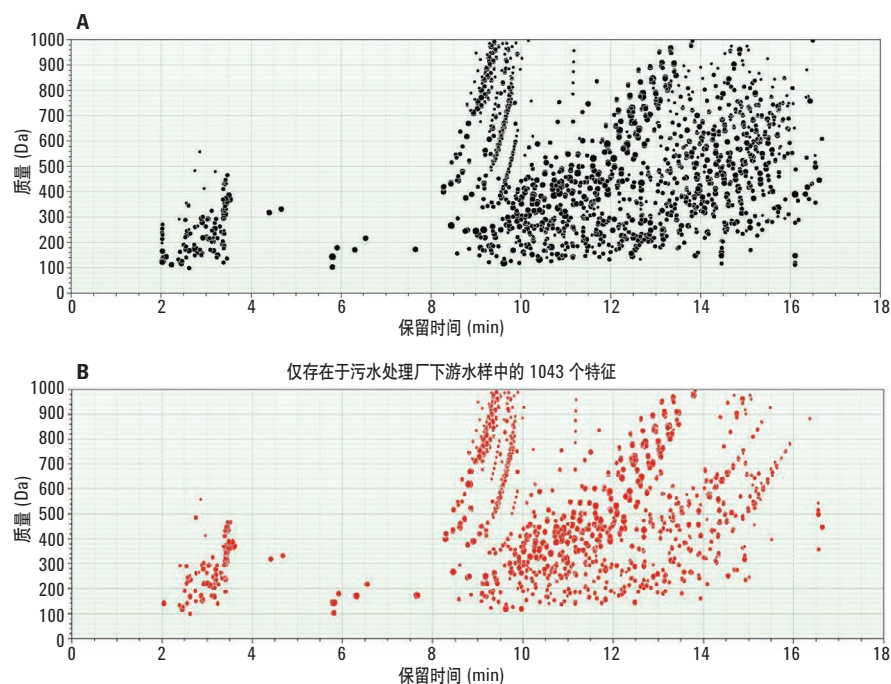


图 1. 利用 MFE 在污水处理厂下游河水样品中发现的特征。A) 所有特征, B) 污水处理厂入水中特有的特征

然后将得到的精确质量数 MS/MS 数据提交至安捷伦法医毒理学个人化合物数据库与谱库中进行鉴定。图 2 显示了通过完美匹配采集质谱图和谱库质谱图对一种名为卡马西平的抗惊厥和情绪稳定药物进行鉴定的示例。这一结果揭示了具有精确质量碎片离子信息的全面质谱库实用性的重要性⁴。

对于精确质量数据库或谱库中不存在的化合物，则在 ChemSpider 和 PubChem 等通用化学数据库中搜索其总化学式。这类搜索可得到关于可能结构的数百个匹配结果。为缩小范围并对某种总化学式的阳性匹配结果进行排序，使用安捷伦分子结构关联 (MSC) 软件进行电脑模拟碎裂。输入数据为未知化合物的分子式和实测精确质量数 MS/MS

数据。MSC 软件随后将总化学式提交至 ChemSpider 搜索并根据由实测质量碎片计算得出的匹配对阳性匹配结果进行排序。从 MSC 中排名较高的匹配结果中选择最可能

的化学结构，如碘帕醇的示例所示（图 3）。采用确定标准品对最终的确切鉴定结果进行验证。

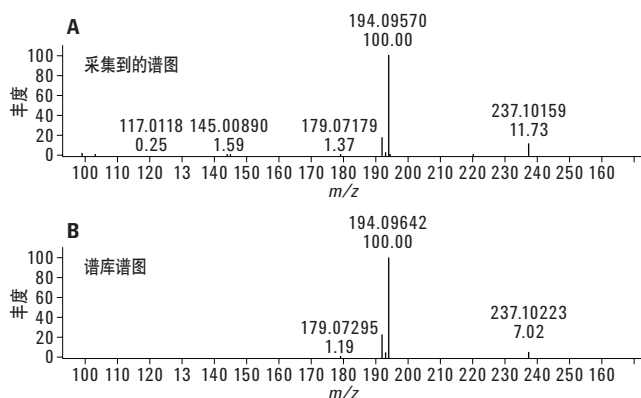


图 2. 在下游水样中检出的药物卡马西平的结构、采集到的谱图 (A) 和谱库谱图 (B)

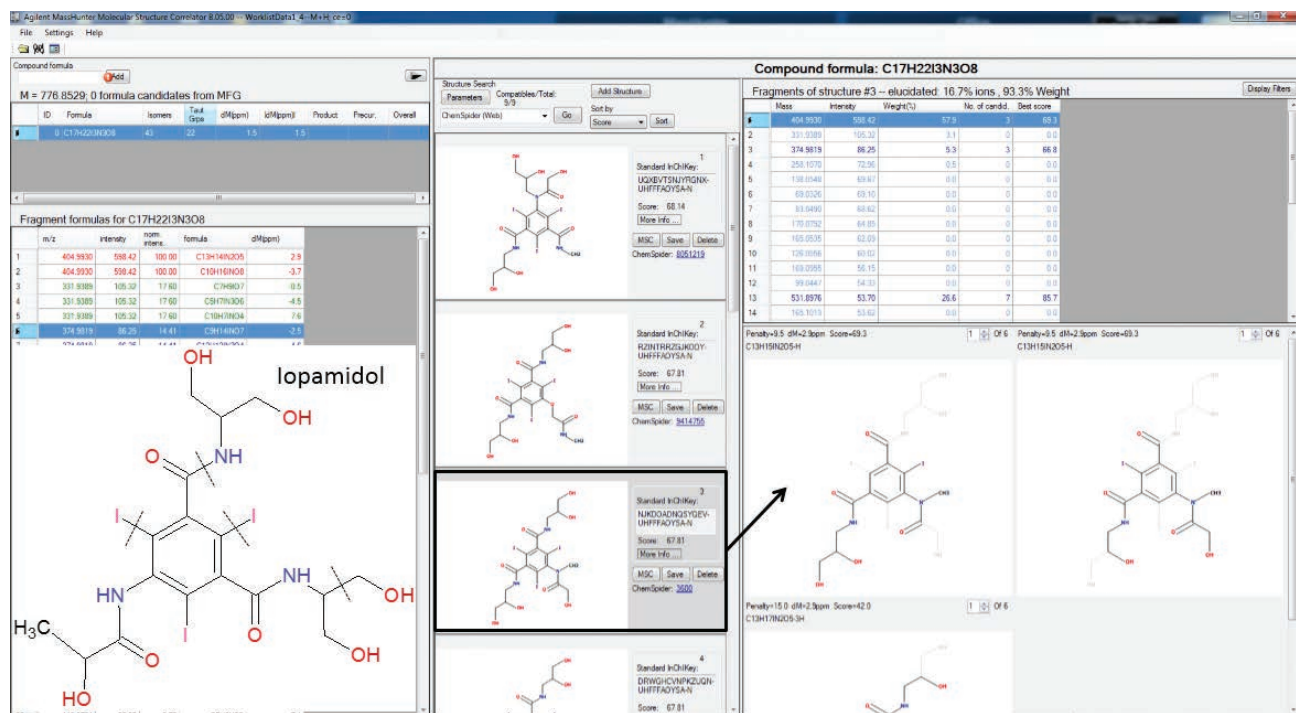


图 3. 使用母离子和子离子的精确质量数据、Agilent MassHunter 分子结构关联 (MSC) 软件以及 ChemSpider 对碘帕醇进行的鉴定

结论

使用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统和 Agilent MassHunter 统计与定性分析软件包套装分析从水处理厂上游及下游采集到的河水样品。结果得到一种非靶向筛查方法，该方法可检出 890 多种未知化合物。提交目标化合物以便采用精确质量数据库进行鉴定，结果得到 150 种可能污染物。采用具备谱库匹配功能的 MS/MS 分析方法鉴定出 21 种污染物，并采用确定标准品对另外 32 种污染物进行了确认。对于数据库或谱库中不存在的化合物，则采用电脑模拟碎裂与 ChemSpider 搜索相结合。这些结果将用于进一步扩展精确质量数据库和谱库中存在的化合物，以便进行未来的研究。

参考文献

1. M. Gust, *et al.* "Effects of Short-Term Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Different Pharmaceutical Mixtures on the Immune Response of the Pond Snail *Lymnaea stagnalis*" *Science of the Total Environment* 445-446(0): 210-218 (2013)
2. R.H. Triebskorn, *et al.* "Ultrastructural Effects of Pharmaceuticals (Carbamazepine, Clofibric Acid, Metoprolol, Diclofenac) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) and Common Carp (*Cyprinus Carpio*)" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(4): 1405-1416 (2007)
3. B.I. Escher, *et al.* "Most Oxidative Stress Response in Water Samples Comes from Unknown Chemicals: The Need for Effect-Based Water Quality Trigger Values" *Environmental Science & Technology* (2013)
4. M. Zedda and C. Zwiener "Is Nontarget Screening of Emerging Contaminants by LC-MS Successful? A Plea for Compound Libraries and Computer Tools." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403(9): 2493-2502 (2012)

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

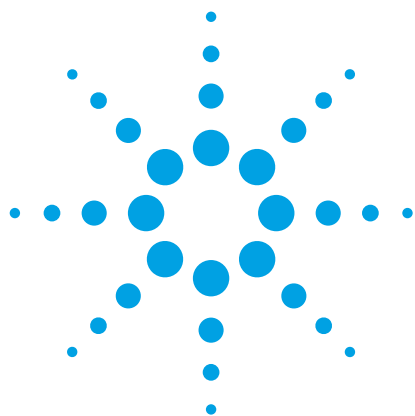
www.agilent.com

本文中的信息、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 2 月 27 日，中国出版
5991-3967CHCN



Agilent Technologies



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, 可用于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 and 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 <i>m/z</i>		
采集速度	2.5 质谱图/秒		
分辨率	在 <i>m/z</i> 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。

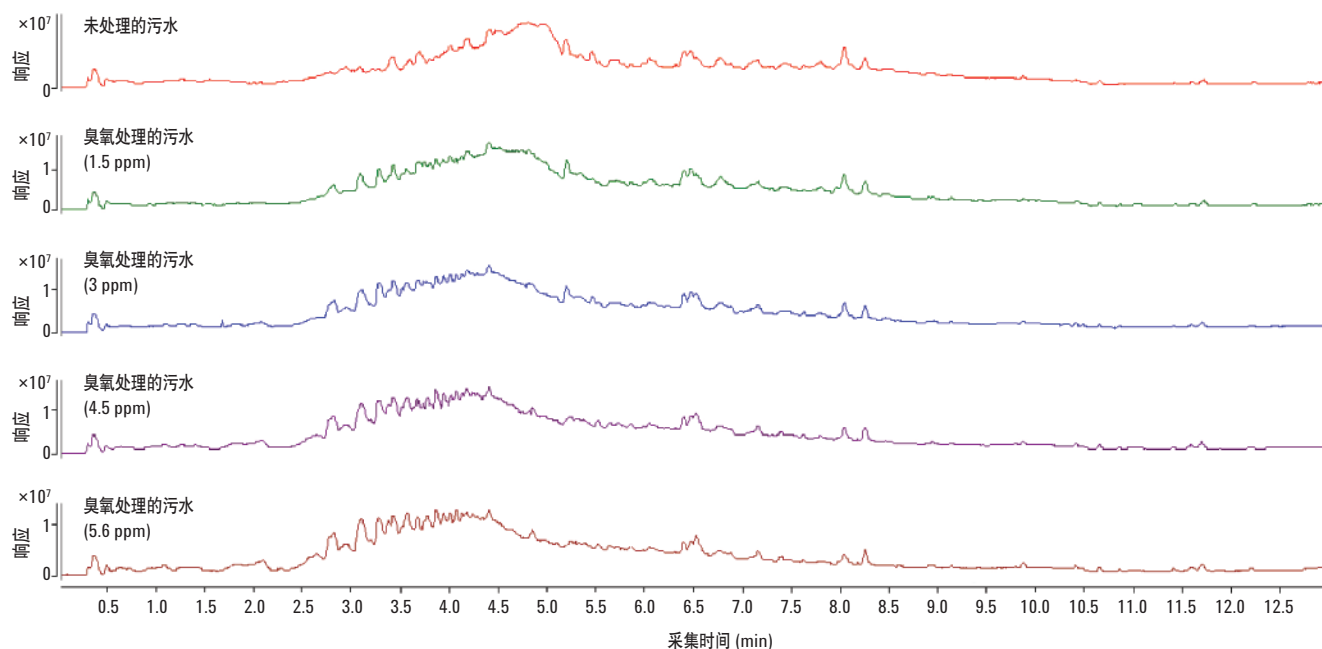


图 1. 未处理污水以及使用各剂量臭氧处理的污水的总离子色谱图 (TIC)

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）。

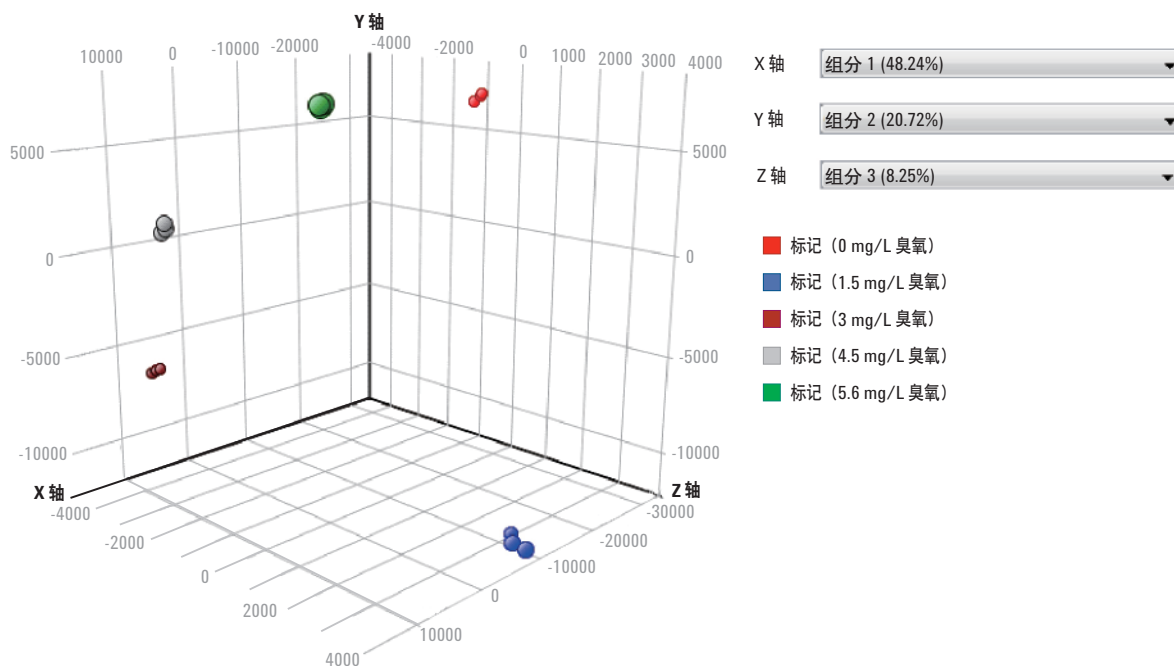


图 2. PCA 表明可以清晰区分使用不同剂量臭氧处理的样品。每组样品重复分析三次，聚类仍非常接近。

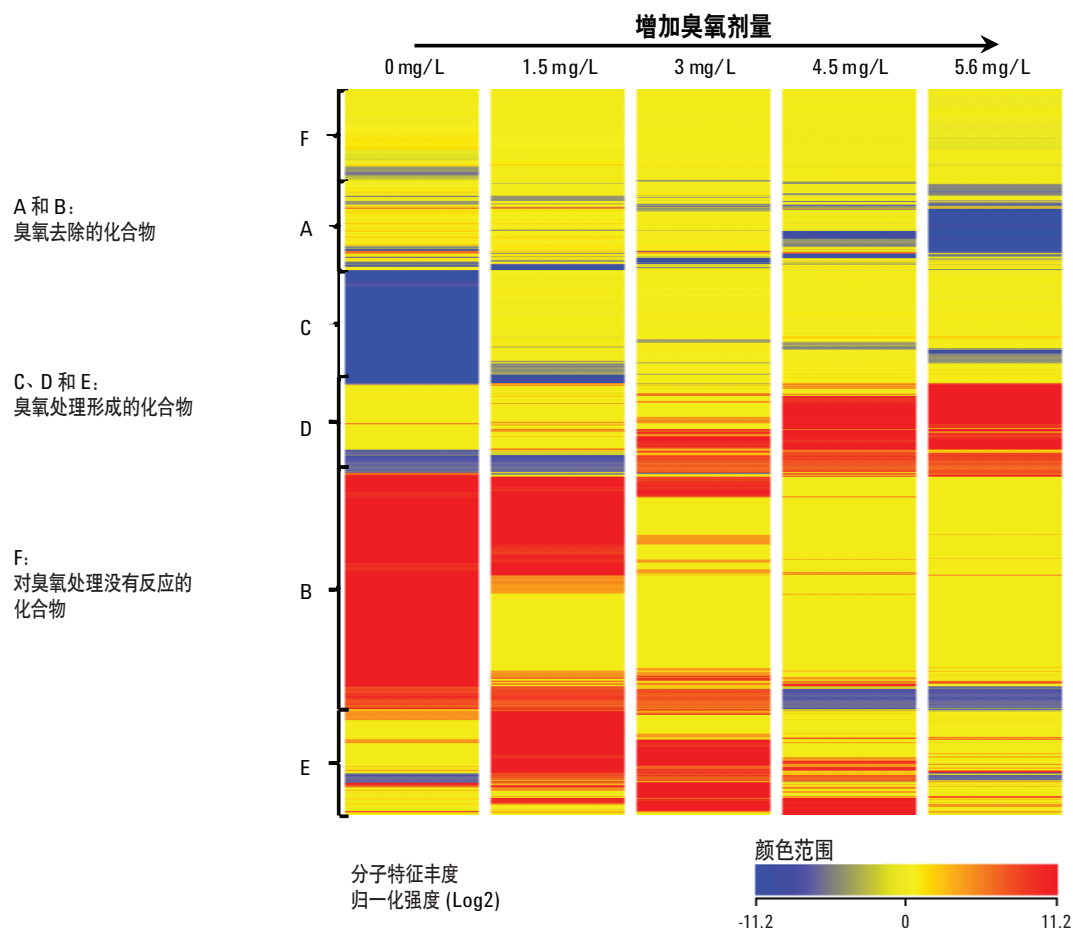


图 3. HCA 显示了对臭氧处理有不同响应的化合物组别

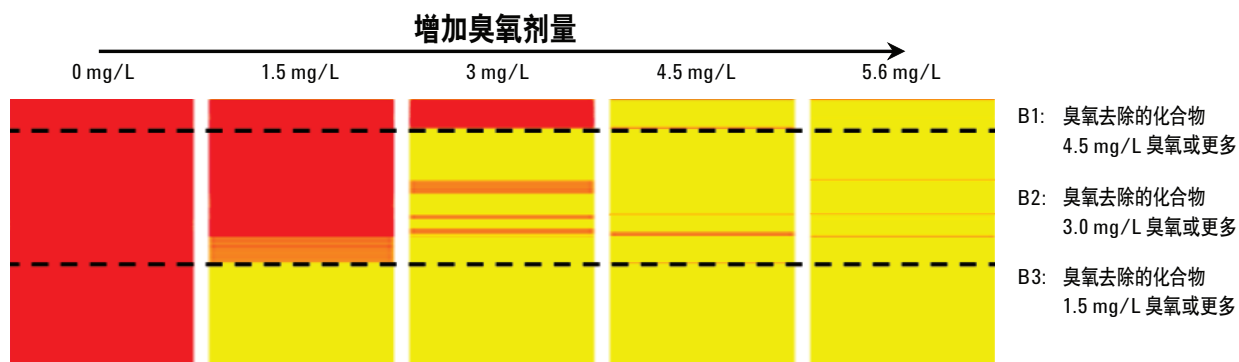


图 4. 图 3 中 B 组的展开图，显示了三个需要用不同剂量的臭氧才能将其从污水中去除的亚组 (B1、B2 和 B3)

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

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) 中选出一化合物进行监测，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)。

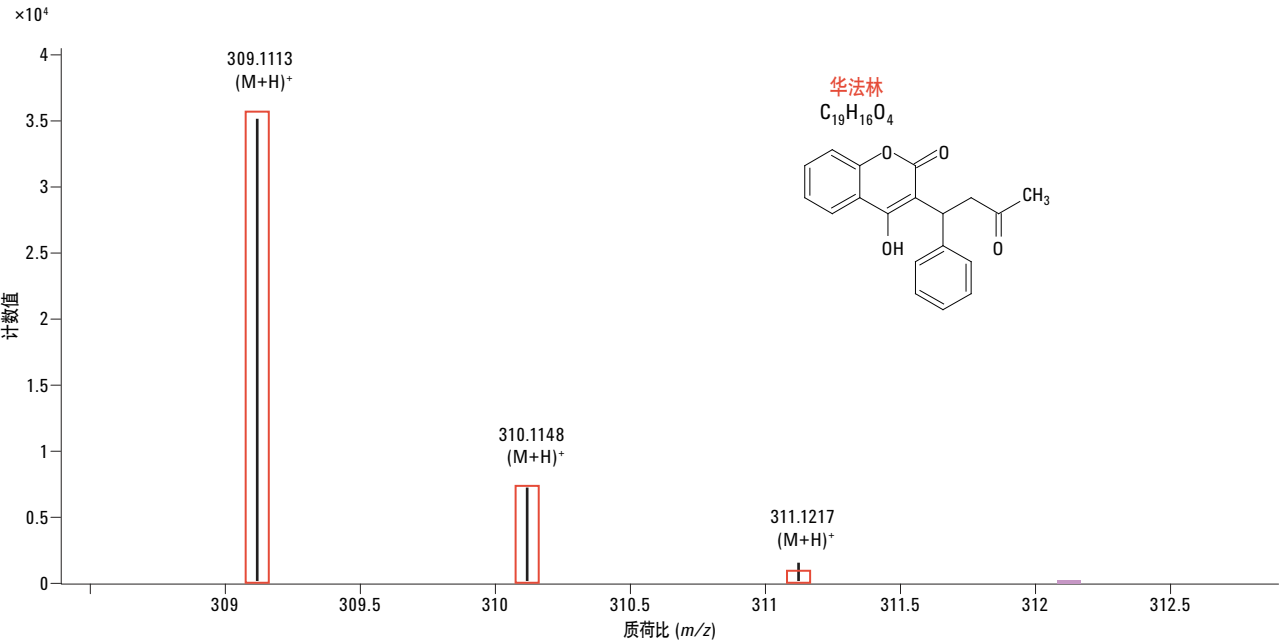


图 5. 使用 MPP ID 浏览器和安捷伦 METLIN PCDL 数据库鉴定出 B3 亚组中的一个化合物是华法令。鉴定得分值为 97 (最大值为 100)，红色矩形代表华法林的理论离子簇

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详细信息，请访问我们的网站

www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

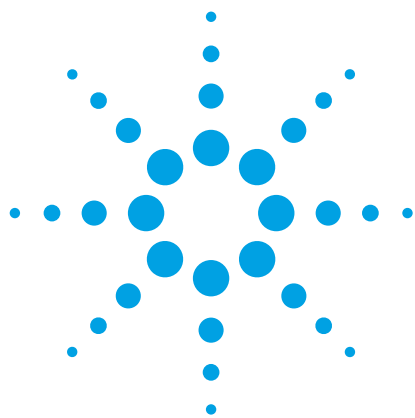
安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

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



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 µg/mL 的三氯蔗糖储备液，并置于 -18 °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 × 2.1 mm，1.8 µm 粒径（部件号 959741-902）
柱温	25 °C
进样量	20 µL

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。

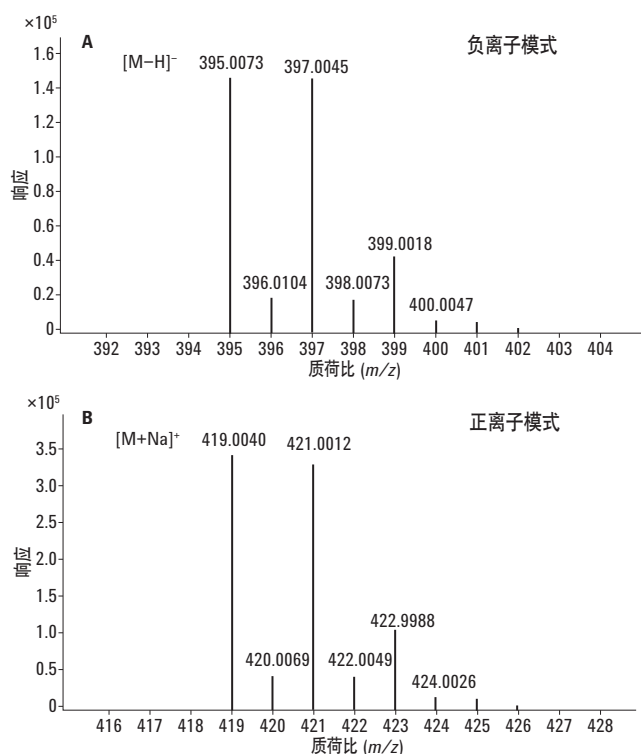


图 1. 使用 Q-TOF LC/MS 系统分别在负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下分析三氯蔗糖所得的结果，其中显示了测定的精确质量数。在正离子模式下，三氯蔗糖以其钠加合物 $[M+Na]^+$ 的形式在 m/z 419.0040 处得以检出。在负离子模式下观察到 m/z 395.0073 处的去质子化分子 $[M-H]^-$ 。

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 所推测的碎裂途径。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。

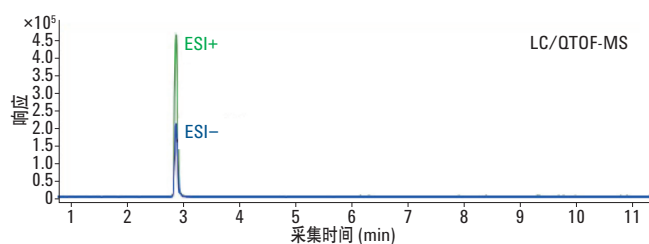


图 2. 使用 Q-TOF LC/MS 系统分析三氯蔗糖标准液，比较在正负离子模式下所获得的信号强度

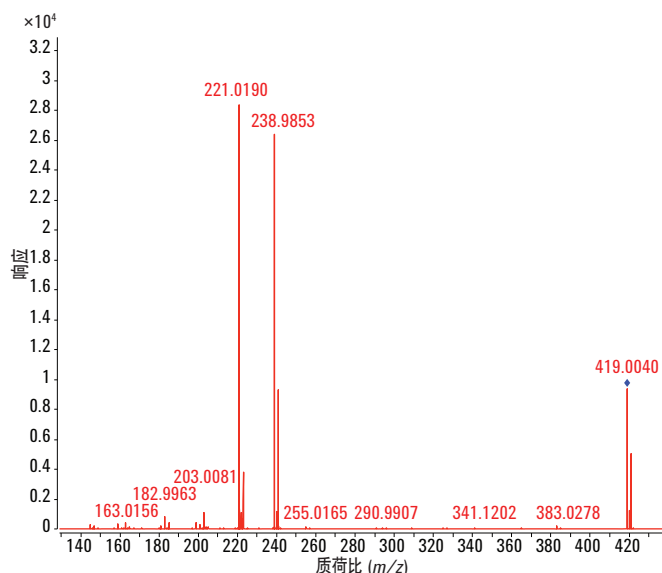


图 3. 三氯蔗糖钠加合物的精确质量 MS-MS 谱图（正离子模式）

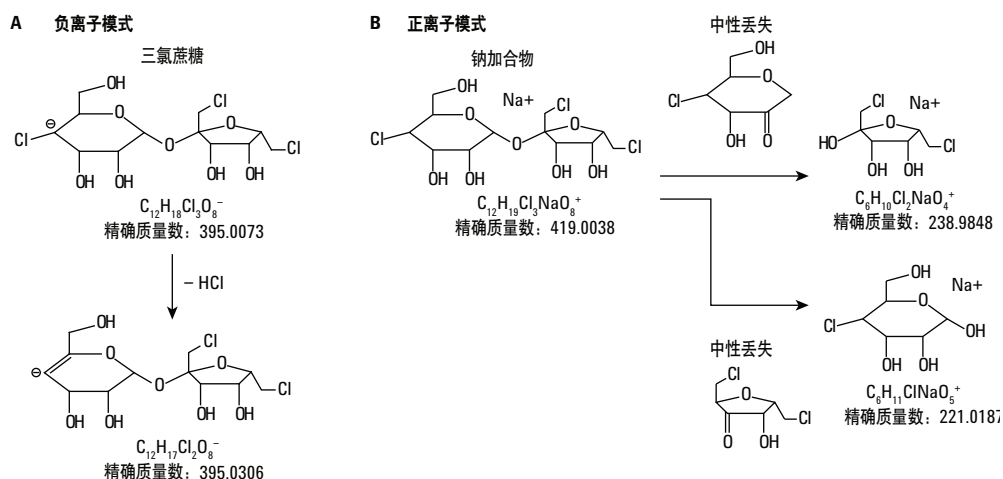


图 4. 根据推断得出的正负离子模式下 MS/MS 对三氯蔗糖的碎裂途径，其中显示了精确质量数

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)。

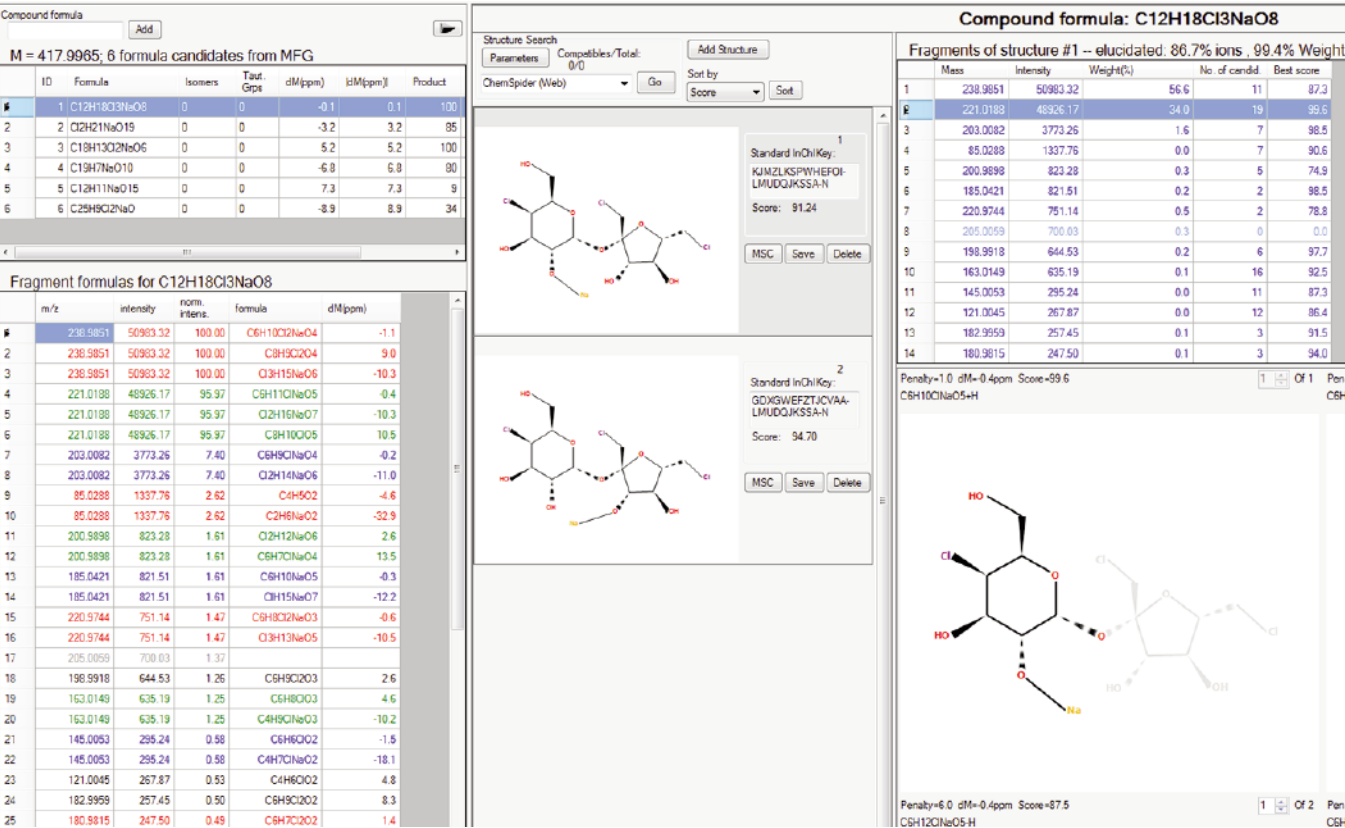


图 5. 通过 MSC 分析显示钠位于葡萄糖环上的三氯蔗糖的钠化分子碎片

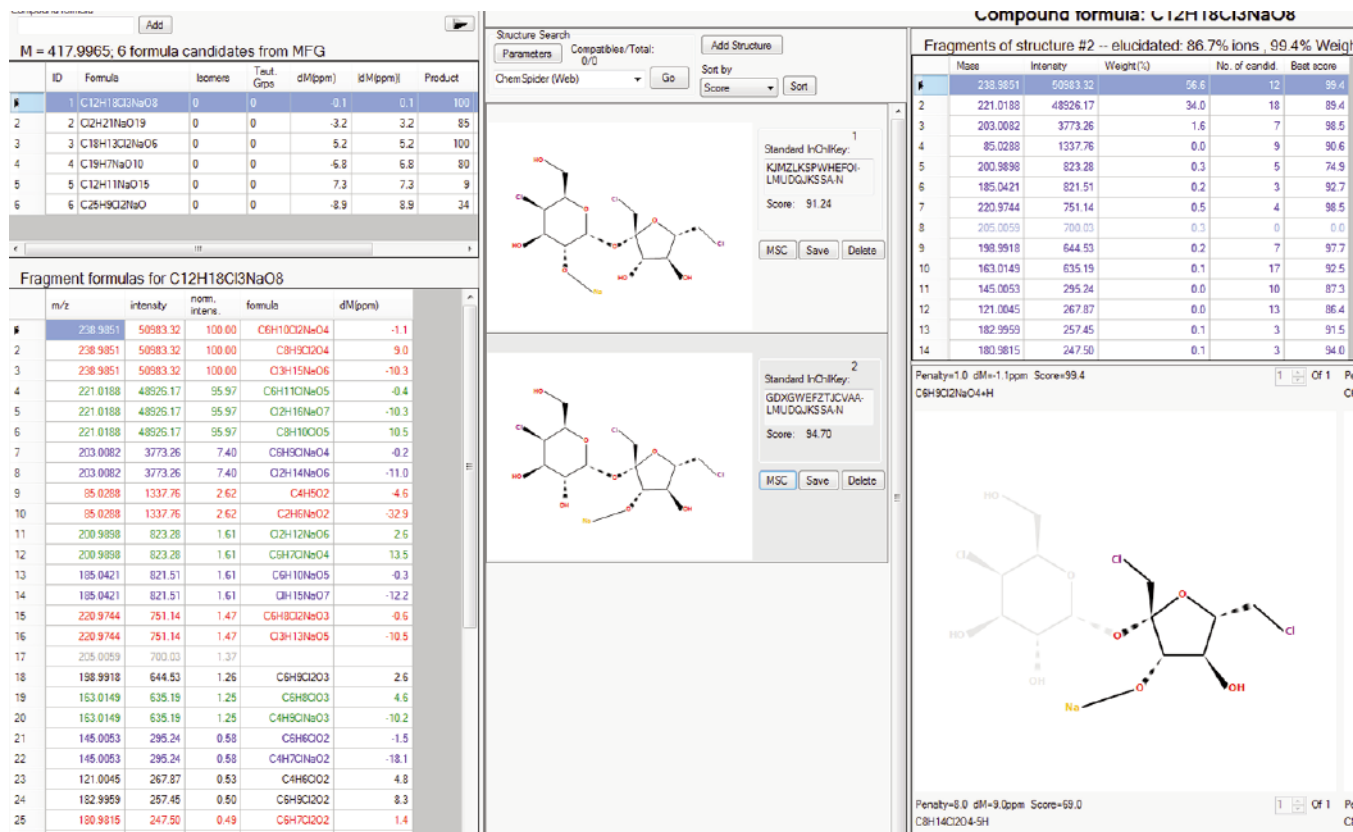


图 6. 通过 MSC 分析显示钠位于果糖环上的三氯蔗糖的钠化分子碎片

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。

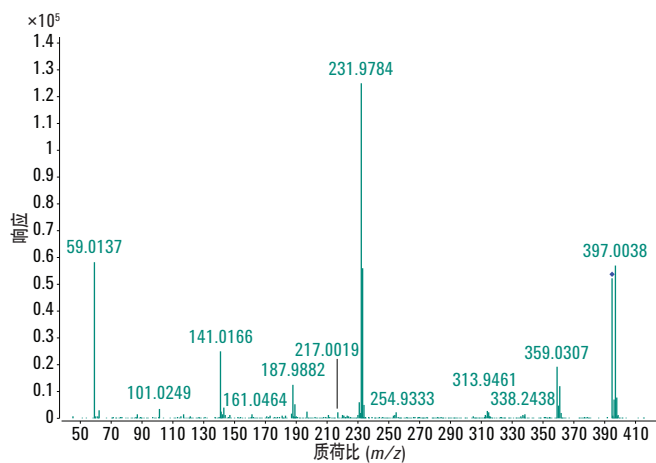


图 7. 三氯蔗糖的 MS/MS 谱图 (负离子模式)

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）。

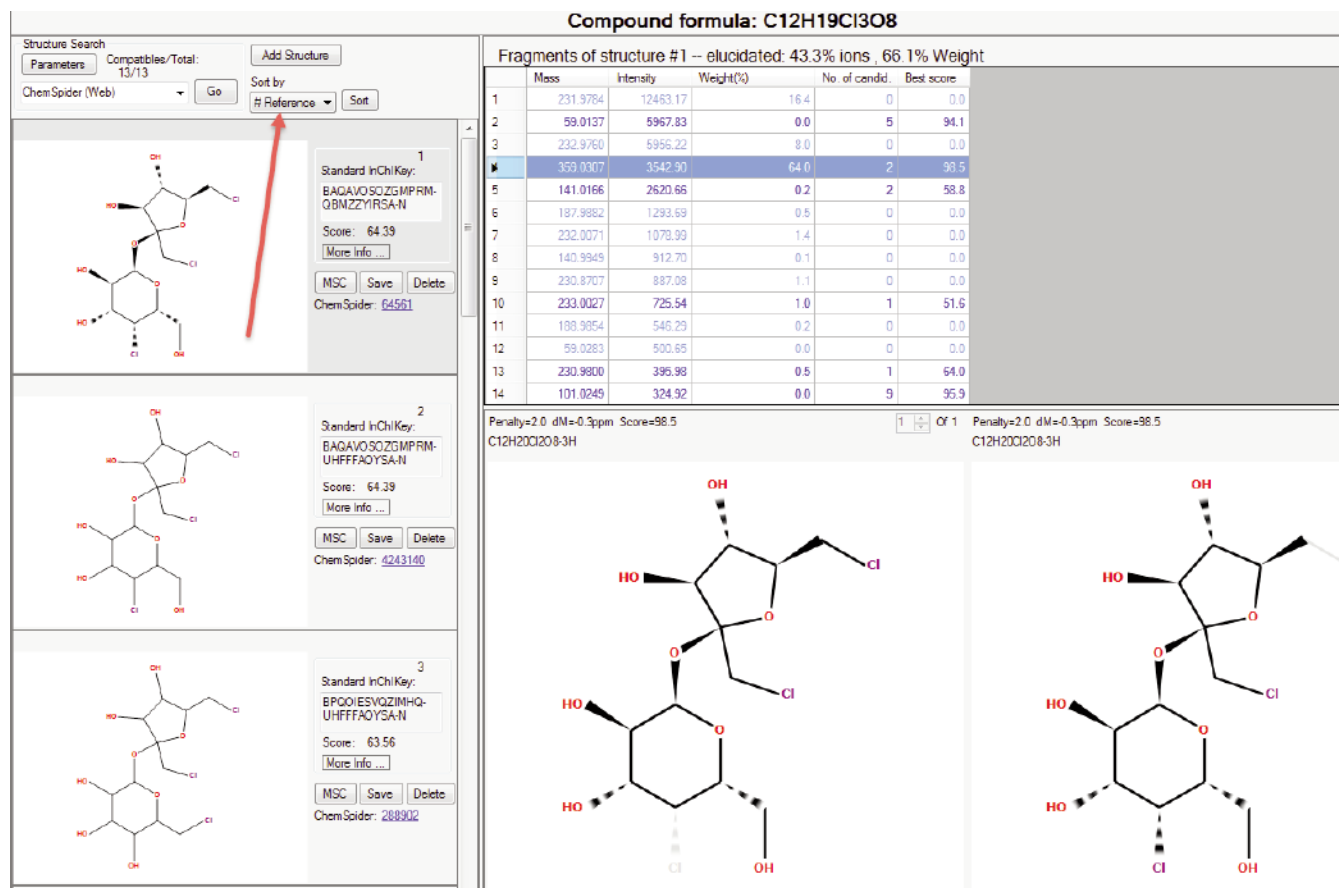


图 8. 使用 MSC 分析负离子模式下所获得的 Q-TOF MS/MS 谱图。当搜索 ChemSpider 时，所有结构的得分相同。按参考文献编号（参考号）排序，三氯蔗糖位居第一（最上方）（见红色箭头）

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

www.agilent.com/chem/cn

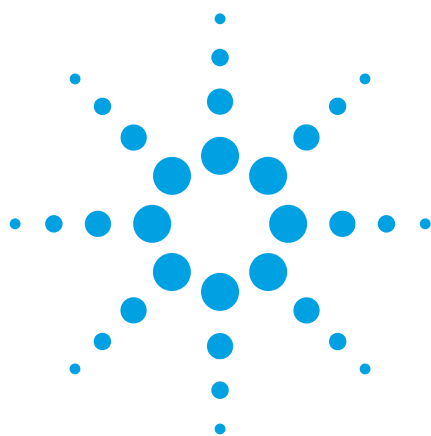
安捷伦公司对本资料中可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的直接或间接损失不承担任何责任。

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



应用氯元素质量过滤器对环境样品的精确质量数据进行分析

应用报告

环境

作者

Imma Ferrer 与 E. Michael Thurman
Center for Environmental Mass
Spectrometry
科罗拉多大学
博尔德，科罗拉多
美国

摘要

氯元素质量过滤器用于筛查 LC/TOF-MS 和 LC/QTOF-MS 数据文件，从而发现含氯的化合物。氯元素质量过滤器使用 Mass Hunter 软件生成含氯化物的分子式。本文例举了对药物污染的环境水样（来自废水排放污染的南普拉特河）的分析。氯元素质量过滤器是一个实用的数据分析工具，可应用于环境化学领域中复杂样品的分析。

引言

LC/TOF-MS 和 LC/QTOF-MS 产生的数据文件包含着数千个离子的信息，采用人工技术难以处理。因此使用软件使数据分析变得快速而高效是非常重要的。在本应用报告中，我们介绍了这样的一个数据分析工具——氯元素质量过滤器。许多农药和药物产品中含有氯，它们是重要的环境分析对象。由于氯元素含有 ^{35}Cl 和 ^{37}Cl 两种同位素，因此含单个氯原子的分子可以产生特征性的 $A+2$ 模式的同位素峰。此外，由于 ^{37}Cl 存在同位素质量亏损，从而使分子中氯元素的鉴定变得相对容易 [1]。含一个以上氯原子的分子可以产生 $A+2$ 和 $A+4$ 模式的同位素峰，这一现象特征性强，一般在任何质谱书中都可查阅到，对于含氯化物的鉴定非常关键 [2]。

在本应用报告中，我们设定 MassHunter 软件参数，使其自动实现从废水污染的地表水水样数据文件中生成含氯化物的分子式。此外，自动输出的报告包含一个针对法医或农药数据库的搜索结果，方便化合物的鉴定。

此时，用户只需要审核数据报告以达到质量控制和质量保证的目的。氯元素质量过滤器可处理任何环境样品的 .d 格式数据文件，如农药残留的食品或药物污染的水样。



Agilent Technologies

实验条件

任意一款 Agilent 6200 或 6500 系列精确质量质谱仪，均可用于获取该分析所需的数据文件，我们使用 6220 质谱仪获取分析地表水中药物的数据文件，地表水样品来自被丹佛市区居民生活废水污染的南普拉特河。数据文件为 .d 格式，可直接导入 MassHunter 软件包的定性分析软件进行分析。所有 6200 或 6500 系列精确质量质谱仪均可采用该定性分析软件进行数据分析。

结果与讨论

应用氯元素质量过滤器

氯元素质量过滤器的使用分八步，第一步首先要打开定性分析软件包及目标 .d 文件。

步骤 1. 点击绿色图标，在定性分析软件包中打开目标 .d 文件。点击 <Find Compounds Menu> (见图 1)，打开 <Find by Molecular Feature> 选项。点击图 1 中蓝色箭头所指图标可激活该程序。打开化合物过滤选项，设置响应相对高度为 1.5%、绝对高度为 10000。对于较低丰度化合物的测定，相对高度也可不设定。当然，这些设置可能需要根据具体仪器和数据的噪音水平进行调整。这三项设置可以对复杂样品信息进行过滤，并可充分利用软件功能去发现含氯化合物的小色谱峰。

其它需要设置的有离子种类，设置 +H 和 +Na 两种阳离子类型，负离子设置为 -H。提取小分子（色谱峰的）的信息并选用响应大于 1000 的峰高数据。同样，此设置可能需要根据具体仪器背景和样品噪音进行调整。<Charge State> 设置为 0.0025 加 7 ppm 的峰间距，同位素峰模型设置为普通的有机分子，电荷状态分配的最大极限设置为 1。<Mass Filter> 和 <Mass Defect> 均无需设置。<Results> 设置为提取 EIC，关注所有化合物，并删除先前的结果。这些设置可实现程序在“Molecular Feature”意图下的完美运行。

步骤 2. 点击如图 1 所示箭头所指的图标运行“Find by Molecular Feature”程序。该程序可鉴定 .d 文件里所有的离子并将相关离子进行分组，如同位素离子和钠加合离子。该程序不能将碎片离子合理归属，而认为它们是不同的化合物。

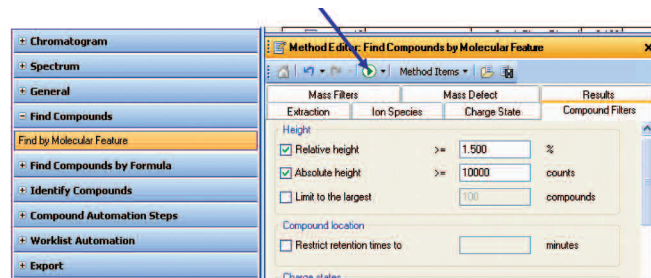


图 1. Find by Molecular Feature 选项设置

步骤 3. 打开 <Identify Compounds> 选项 (图 2)，选中 <Generate Formulas>。打开如图 2 所示的窗口，我们从此表中指定化合物最多含两个氯原子，最少含一个氯原子 (如图 2 箭头所示)。请注意，本例中仅过滤了含 1-2 个氯原子的化合物，但可以选择过滤包含更多氯原子的化合物的参数。图 3 显示了 <Limits> 项和 <Charge State> 项的设置，此设置可得到良好的分析结果。请复制这些参数。

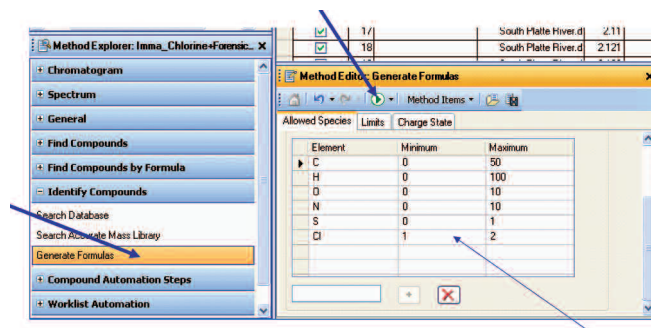


图 2. Identify Compounds 和 Generate Formulas 选项设置

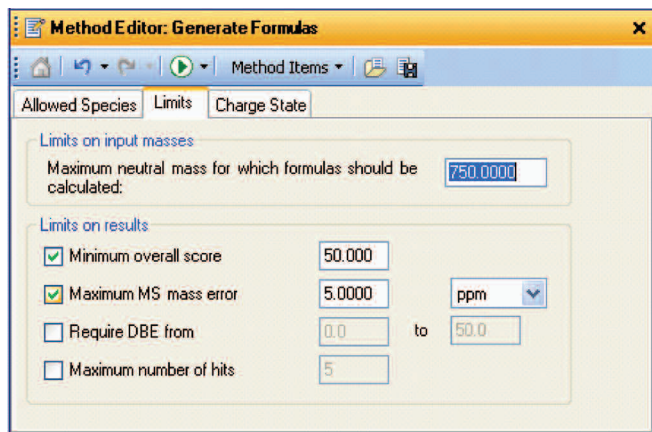


图 3. 其它选项设置

步骤 4. 运行包含氯原子参数的“Generate Formulas”程序。根据步骤 2 中已鉴定出的所有特征生成化合物分子式，并仅能生成包含 1-2 个氯原子的分子式。

步骤 5. 打开 <Search Database> 窗口，点击 <Search Criteria>。按图 4 所示选择 <Molecular Formula> 选项。强制使搜索结果仅显示与生成分子式匹配的化合物（并仅包含 1-2 个氯原子）。下一步选择数据库。这里例举的是法医或农药数据库（图 5）。选项设置如下：阳离子设置为 +H，阴离子设置为 -H，Search Results 项设为空白，Peak Limits 设置为 5，Search Criteria 设置为质量数和 5 ppm。这些设置将保证顺利完成化合物的鉴定。法医数据库收录了超过 7500 多种化合物，包含药物和农药。含氯化合物归入到标有 MFG Formula 的列或分子式生成器中。

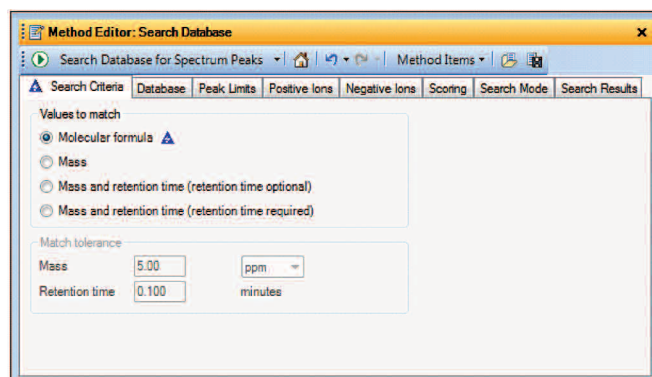


图 4. 根据分子式设置搜索条件

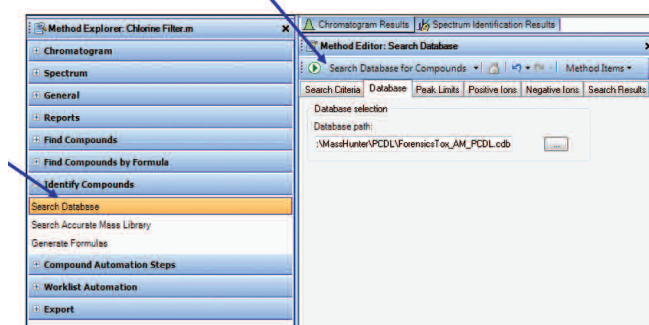
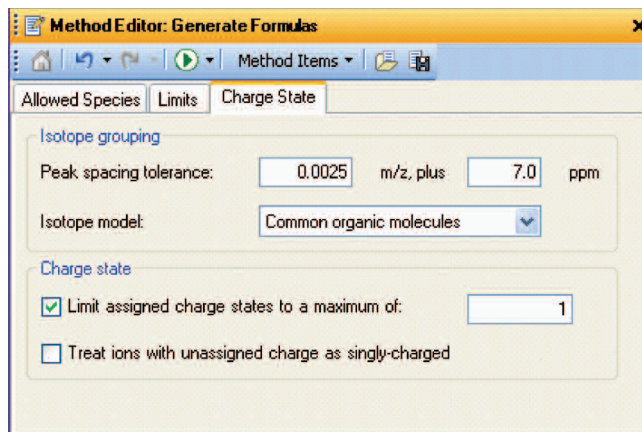


图 5. 使用收录 7500 种化合物的法医数据库的 Search Database 程序

步骤 6. 运行 Search Database 程序。该程序现在开始运行并审查步骤 4 中生成的所有分子式，如果某化合物的分子式在数据库中，则分配给该化合物一个相应的名称。如果某化合物分子式不在数据库中，则最后报告中该化合物的 Name 栏为空白。在这种情况下，所有含氯化合物最合适的分子式会打印在 Molecular Formula Generator 栏中。

步骤 7. 打印报告。报告包括以下栏目：化合物标记、保留时间、中性化合物的质量、名称（如果在数据库中可检索到）、分子式生成器（MFG）元素分子式、MFG 质量精确度差异、数据库分子式（DB）和 DB 质量精确度差异。河水样品的检测报告如图 6 所示。

Qualitative Compound Report								
Data File	South Platte River.d		Sample Name					
Sample Type	Sample		Position		P1-C6			
Instrument Name	Instrument 1		User Name					
Acq Method	Multiresidue_Pesticides.m		Acquired Time		8/10/2009 7:09:22 PM			
IRM Calibration Status	Success		DA Method		Chlorine Filter Automated.m			
Comment								
Compound Table								
Compound Label	RT	Mass	Name	Formula	MFG Formula	MFG Diff (ppm)	DB Formula	DB Diff (ppm)
Cpd 464: Lamotrigine	13.641	255.0077	Lamotrigine	C9 H7 Cl2 N5	C9 H7 Cl2 N5	0.54	C9 H7 Cl2 N5	0.54
Cpd 499: Ketamine	13.858	237.0923	Ketamine	C13 H16 Cl N O	C13 H16 Cl N O	-0.89	C13 H16 Cl N O	-0.89
Cpd 637: C9 H10 Cl N	15.265	167.0502		C9 H10 Cl N	C9 H10 Cl N	-0.39	C9 H10 Cl N	
Cpd 640: C13 H20 Cl N O	15.266	241.1233		C13 H20 Cl N O	C13 H20 Cl N O	0.33	C13 H20 Cl N O	
Cpd 735: C19 H27 Cl N6 O2 S	16.37	438.1611		C19 H27 Cl N6 O2 S	C19 H27 Cl N6 O2 S	-1.36	C19 H27 Cl N6 O2 S	
Cpd 775: C14 H34 Cl2 N10 O2	16.768	444.2245		C14 H34 Cl2 N10 O2	C14 H34 Cl2 N10 O2	-0.5	C14 H34 Cl2 N10 O2	
Cpd 889: C18 H29 Cl N2 O3 S	18.264	388.1583		C18 H29 Cl N2 O3 S	C18 H29 Cl N2 O3 S	1.18	C18 H29 Cl N2 O3 S	
Cpd 1015: Losartan	19.635	422.1629	Losartan	C22 H23 Cl N6 O	C22 H23 Cl N6 O	-1.7	C22 H23 Cl N6 O	-1.7
Cpd 1137: C18 H29 Cl N2 O6 S	21.105	436.1439		C18 H29 Cl N2 O6 S	C18 H29 Cl N2 O6 S	-0.9	C18 H29 Cl N2 O6 S	
Cpd 1159: C28 H41 Cl N4 O2	21.311	500.2929		C28 H41 Cl N4 O2	C28 H41 Cl N4 O2	-2.1	C28 H41 Cl N4 O2	
Cpd 1194: C18 H33 Cl N2 O4	21.64	376.2118		C18 H33 Cl N2 O4	C18 H33 Cl N2 O4	2.91	C18 H33 Cl N2 O4	

图 6. 应用法医数据库搜索首次测定河水中一种抗抑郁药的输出报告 [3]。

步骤 8. QA/QC 人工报告。最后，分析人员有必要人工审核已检出的含氯化合物。这一步需要人工调出合适保留时间的相应离子信息并核对该离子的同位素峰信息特征。图 7 为一个在受附近废水流入污染的南普拉特河中检出了拉莫三嗪的实例。拉莫三嗪是一种抗抑郁药，它在样品中被检出，保留时间为 13.4 min [3]。测定的离子质量为 m/z 256.0150，并显示出 A+2 和 A+4 同位素峰特征，质量分别为 m/z 258.0121 和 m/z 260.0092。请特别注意该化合物的 A+2 和 A+4 相关同位素峰出现质量亏损。两峰的相对质量亏损分别是 -0.0029 和 -0.0029。这些值非常接近理论值 -0.0030，是分子中存在两个氯原子的有力证据 [1]。这一步是氯元素质量过滤器应用的关键一步，并需人工操作。因为分子式生成器运行仅仅关注离子质量，它可能产生一些不符合同位素特征分子式。在该分析南普拉特河样品的实例中，大约获得 100 个可能的含氯化合物峰，其中 20 个已根据相对质量亏损和同位素特征确定含氯元素。

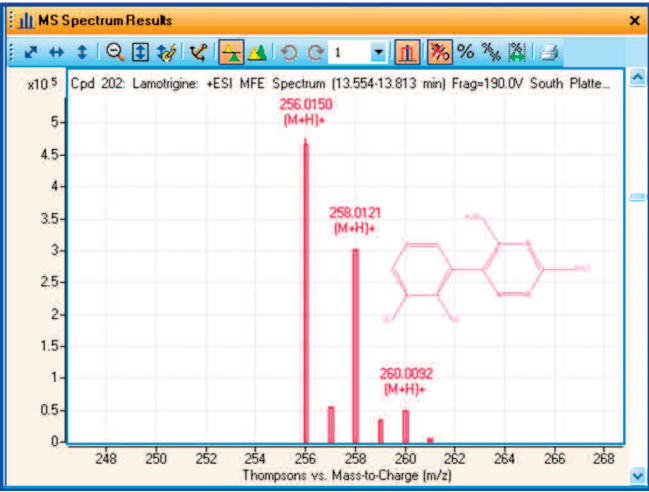


图 7. 拉莫三嗪的质谱图

在这 20 个不同的离子中，有 15 个离子是不同的组分，其余 5 个离子是这些离子的碎片离子，这已经通过保留时间匹配得到确证。例如，图 8 为西替利嗪的结构，通过法医数据库检索，它的保留时间 18.3 min 与两种离子吻合，分别是 m/z 为 389.1626 的质子化分子和 m/z 为 201.0466 的碎片离子。结合质量精确度、数据库匹配和碎片离子识别，证明采用氯元素质量过滤器发现和鉴定废水污染水样中的微量氯化物非常有效。本报告介绍的氯元素质量过滤器同样适用于被农药污染的食品样品或其它类似的环境样品分析。

结论

应用 Agilent 6200 系列或 6500 系列 TOF 或 Q-TOF 精确质量 LC/MS，以及 5.0 版 MassHunter 定性分析软件，通过氯元素质量过滤器可有效筛选出所有包含 1-2 个氯原子的化合物的 MS 数据。这个过程可以修改为筛选任意特定数量的卤族元素或任意其它特定元素，例如氟元素过滤器或铁元素。通过使用 Worklist Automation 选项使程序自动化运行，然后进行人工 QC 鉴定。

参考文献

1. E.M. Thurman, I. Ferrer, 2010, The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formula by accurate mass: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 397: 2807-2816.
2. R.M. Smith, 2004, Understanding Mass Spectra, John Wiley & Sons, Inc., New York, 290p.
3. I. Ferrer, E.M. Thurman, 2010, Identification of a new anti-depressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry: *Analytical Chemistry*, v. 82: 8161-8168.

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

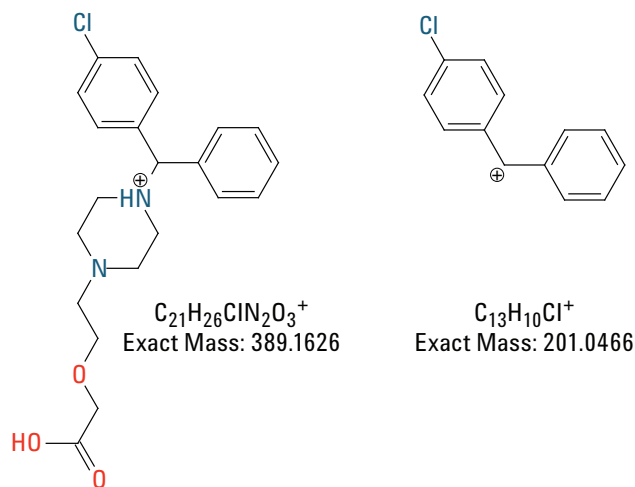


图 8. 同时在保留时间 18.3min 出现的西替利嗪的两个离子

www.agilent.com/chem/cn

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。

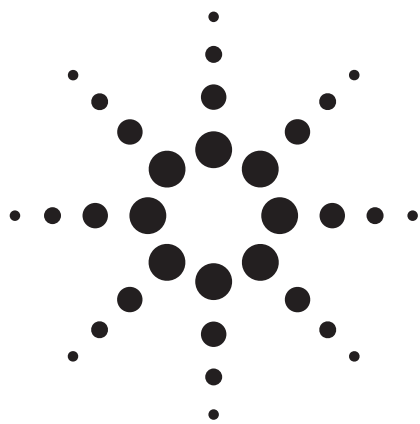
© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011

2011 年 12 月 5 日 中国印刷

5990-9431CHCN



Agilent Technologies



超高分辨率 Q-TOF 液-质联用系统和精确质量数用于环境样品的分析：怎样的分辨率能够满足要求？

应用简报

食品安全和环境分析

作者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman

环境质谱中心

环境工程系

美国科罗拉多大学

科罗拉多州博尔德市 80309

Jerry Zweigenbaum

安捷伦科技公司

威尔明顿，DE 19808

摘要

本研究利用安捷伦 1290 Infinity 液相色谱/6540 精确质量数 Q-TOF 液质联用系统测定分析水样中磺胺类抗生素和合成代谢类固醇的高分辨率和高质量精度。首次在四极杆-飞行时间质谱仪上，用高分辨（> 20000 FWHM）进行了符合欧盟关于禁用药物的鉴定点要求的分析。

前言

欧盟对于高分辨质谱分析食品和食物产品中禁用兽药的要求是，在 10% 峰谷的分辨率大于 10000。这相当于使用半峰宽（FWHM）时的分辨率是 20000 [1]。对于精确质量数，每个离子的鉴定点是 2 或是 2.5，如二级质谱分析，其总鉴定点是 4，因此可以对化合物进行确认定性分析 [1]。已经利用系统被用于环境水样中的鉴定点概念发表了几篇用 Q-TOF 分析水样的文章 [2]。然而，在所有发表的 TOF 应用中，10% 峰谷的分辨率都没有满足大于 10000（20000 FWHM）的最低要求条件。其原因是，飞行时间质谱在分辨率为 20000（FWHM）时无法分开小分子的碎片离子（ m/z 小于 150 的离子）。本应用简报介绍了使用超高分辨率的安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液-质联用系统用于分析液体样品中的抗生素、合成代谢类固醇和其它药物，其在 10% 峰谷的分辨率轻松超过大于 10000（20000 FWHM）的要求。



Agilent Technologies

此外，它能够区分合成代谢类固醇、康力龙的同量异构离子，可以分辨质量数相差 0.252 的 CH_2CH_2 或 N_2 [3]。之前对于这类离子的分析被认为只能靠傅里叶质谱 (FT/MS) 或轨道阱质谱 [4] 来完成。在本研究中，分析结果优于已发表文章中两种仪器得到的结果 [4]，具有更宽的质量范围，从 m/z 69 到 m/z 279。结果显示了超过 20000 (FWHM) 要求的分辨率，定义了小分子 (小于 m/z 300) 的分辨率的要求。使用一级质谱和二级质谱得到的数据精确度小于 1 ppm。本应用将讨论两个例子：根据欧盟对于兽药的法规 [5]，分析水中的磺胺类抗生素和康力龙碎裂离子。

实验条件

在安捷伦 1290 Infinity 超高分离度液相色谱仪上，在含 0.1% 甲酸：乙腈流动相的条件下，得到磺胺抗生素混合物的高分辨率色谱图。使用安捷伦 ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 2.1 x 50 mm, 1.8 μm 色谱柱 (部件号 959757-902)，梯度分析时间为 10 min。样品是组分浓度为 1 ppm 的溶液，根据灵敏度的要求，进样体积为 5-10 μL 。采用线性梯度，8 min 内从 90% B 至 100% A，维持 2 min，总共 10 min；B 为含 0.1% 的水溶液 (Sigma Aldrich)，A 为乙腈。

安捷伦喷射流离子聚焦串联四极杆质谱的条件：鞘流气温度是 375 $^{\circ}\text{C}$ ，鞘流气流速 11 L/min，干燥气温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ，干燥气流速 10 L/min，雾化器压力 45 psi，毛细管电压 4000 V (正离子模式)，喷嘴电压 0 V。碎裂电压 100 至 190 V，其它参数为自动调谐的参数。

结果与讨论

食品或水中磺胺类抗生素的鉴定

图 1 为三个磺胺类抗生素的超高压液相色谱图：磺胺二甲氧嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶。其中两个抗生素被用于 ppm 浓度的猪饲料 (磺胺二甲氧嘧啶和磺胺甲氧嘧啶)，而磺胺二甲氧嘧啶被用于家养鸟的饮用水中；因此，它们可能会出现于食品或水里。而且有报道说，因为污水排放的关系水中经常出现磺胺类抗生素。重要的是，结果显示，高分辨率质谱很容易鉴定这些化合物，并符合欧盟关于食品或水中化合物鉴定点的要求 [1-2, 5]。

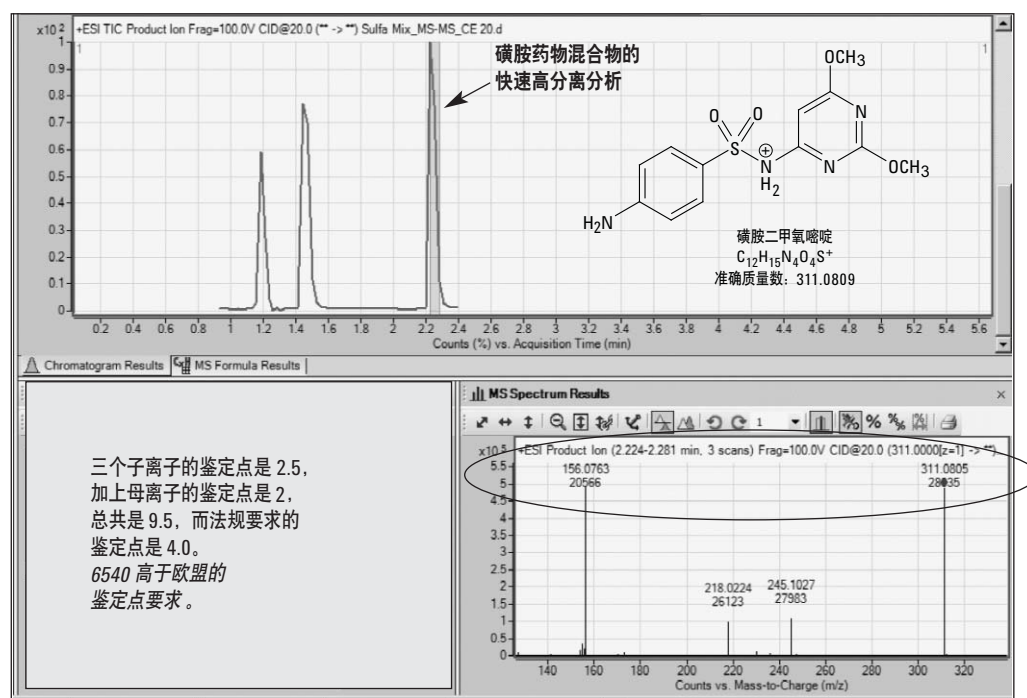


图 1. 安捷伦 6540 超高分辨率精确质量数 Q-TOF 液-质联用系统分析水中的磺胺药物

在快速梯度条件下，三个药物的分析时间小于 3 min，峰宽小于 6 s（见图 1）。磺胺二甲氧嘧啶的分子离子峰的质量精确度和分辨率见图 1。每个组分的测量质量数与理论值的误差都在 0.5 毫道尔顿内，相当于一个电子的质量。根据欧盟指令关于禁用兽药检测鉴定点的要求，分子离子峰可以得到 2 分，在二级质谱中，三个碎片离子中每个离子得到 2.5 分，总共是 9.5 分（见图 1）。所有离子的分辨率都大于 10000（10% 峰谷）或 20000

（FWHM）。磺胺类药物中有一个特征离子，其准确离子是 m/z 156.0114，见图 2，所有的磺胺类药物的碎片离子都含有这个离子。所以，这个离子的准确质量数可以用于扫描其它的磺胺类药物或代谢物。对于这个特征离子，分辨率超过最低要求值 20000（FWHM）。欧盟指令没有规定准确质量，但只是显示了测量值与理论值的误差值。还有的就是，还有一个 m/z 156 的同量异构离子，它的质量数是 156.0768，是磺胺二甲氧嘧啶的另一半结构（见图 2）。

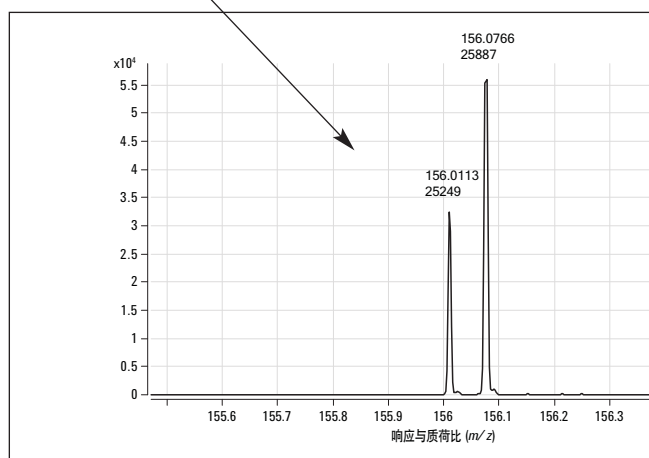
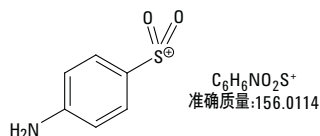
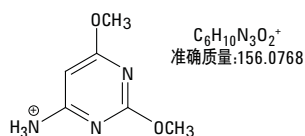
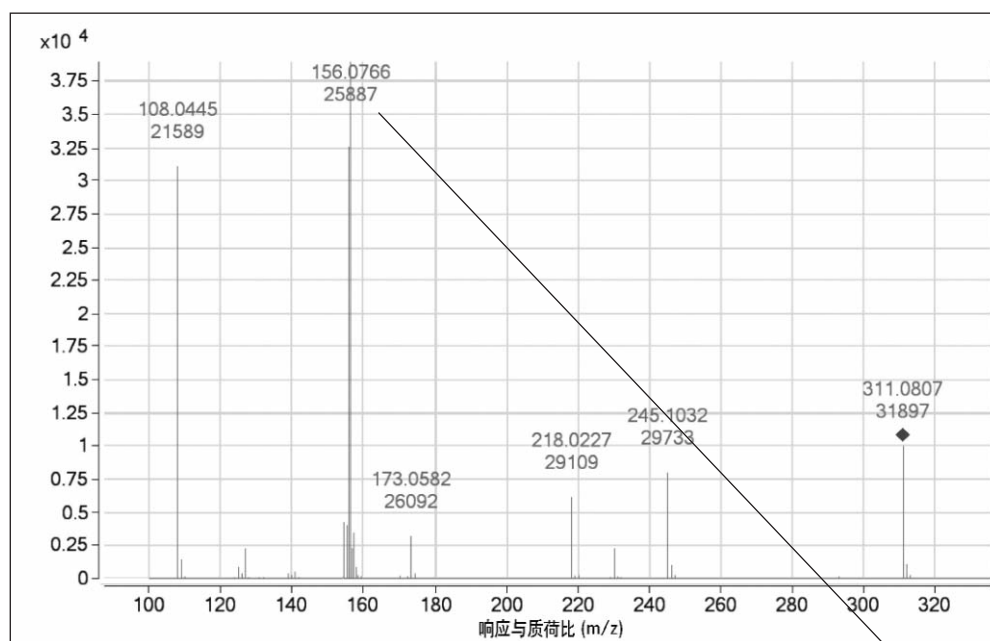


图 2. m/z 156 的同量异构离子

利用精确质量测定的磺胺二甲氧嘧啶分子式随着误差 10 ppm、5 ppm 和 2 ppm 的降低而减少，从 10 ppm 时的 10 个可能分子式，到 5 ppm 的 6 个化学式，到 2 ppm 的 2 个化学式，化学组成计算用 C、H、N、O、S 和 P。图 3 所示，对于磺胺二甲氧嘧啶，将合适的原子输入后计算得到的同位素分布结果。同位素分布中强度较高的 A+2 峰（图 3）表明，分子中含有硫元素。所以，只有误差在 2 ppm 时，才能得到正确的磺胺二甲氧嘧啶分子式。有关使用相对质量亏损来计算分子式的详细信息可参考 LC/TOF-MS 分析书中文献 3。一般情况下，根据一些知名期刊关于未知物分析的发表要求，精确度误差限值设定在 5 ppm。然而，很快能够发现，在遇到大量可能存在的分子式时，这个精度限制是不够的。因此，对高分辨率和精确质量分析来说，建议把精度误差限设为 2 ppm 以下，并且使用同位素分布和丰度。MassHunter 软件包含这些功能。

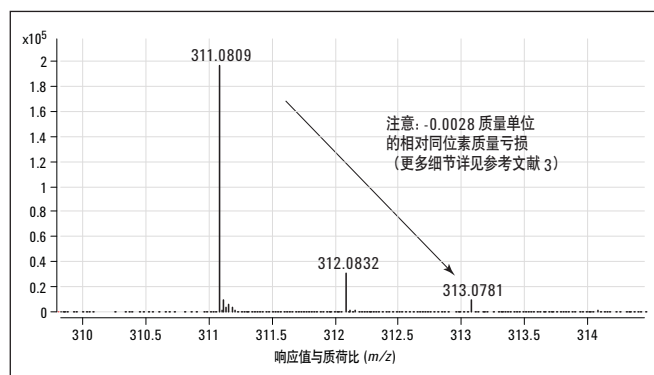


图 3. 磺胺二甲氧嘧啶的同位素分布显示了 A+1 和 A+2 离子，以及硫的相对质量亏损 [3]

康力龙：Q-TOF 液质联用仪上得到的离子的分辨率

N_2 、 CH_2CH_2 和 CO 中性丢失的分子质量数都是 28，可能这对于拥有高分辨率和精确质量数的二级质谱分析来说是最大的挑战之一 [4]。Nielen et al. [4] 的发表文献测定了康力龙（一种禁用合成代谢类固醇）的碎裂丢失，其中包括 N_2 或 CH_2CH_2 的中性丢失，误差等于 0.0252 质量单位。特别指出的是，傅里叶变换质谱和轨道阱质谱可以分辨这样的离子，他们分辨率分别是 ~50000 (FWHM) 和 ~100000 (FWHM)。此外，他们发现，Q-TOF 液质联用仪无法分离同量异构的离子，因此提出了利用超高分辨率的 Q-TOF 液质联用仪来应对这个挑战。

按照这样的方式，我们在安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液质联用上，用分辨率大于 40000 (FWHM) 的二级质谱和色谱的联合方式重复了康力龙的分析实验。如图 4 中所示的， m/z 161.1068 和 m/z 161.1317 这两个子离子代表着因为 CH_2CH_2 和 N_2 的质量差异而不同的同量异构离子。两个中性丢失分子精确计算的质量差异是 0.0252 质量单位，而测量值为 0.00249。表 1 所示为 10 个康力龙二级质谱产生的可能的同量异构丢失的中心分子。值得注意的是，所有碎片离子的平均丢失是 0.0252。这与 CH_2CH_2 和 N_2 的差异非常匹配，标准偏差为 0.0002 质量单位，小于 1%。整个质量范围内，所有碎片离子的质量精度大约是 1 ppm，分辨率为 25000 (FWHM) (见图 5)。因此，安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液质联用仪可以满足康力龙的分析要求，以及满足欧盟关于高分辨率和精确质量数质谱的规定要求。用高分辨质谱得到的分子离子峰和子离子可以准确鉴定禁用的合成代谢类固醇，如康力龙，满足欧盟鉴定点大于 4 的要求。事实上，真正测得的鉴定点等于 $2.0 + 10(2.5)$ ，总鉴定点为 27。

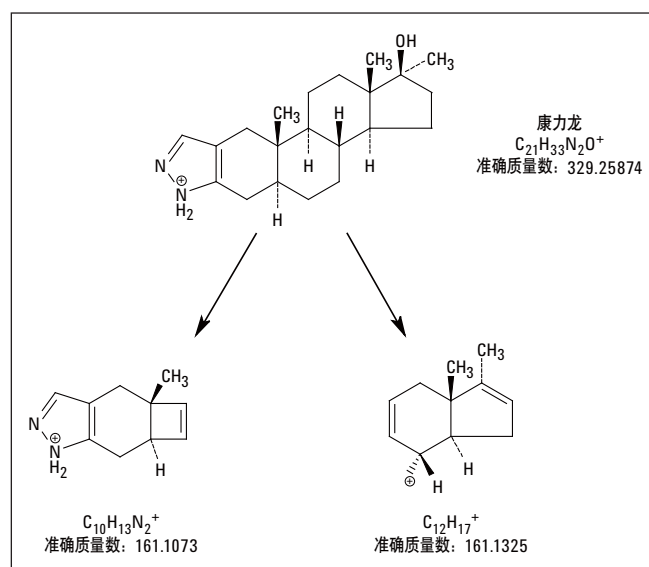


图 4. 禁用合成类固醇（康力龙）的同量异构离子，差异是乙烯离子减去双原子 ($CH_2CH_2-N_2$)，即 0.0252 质量单位

表 1. 康力龙离子的质量精度和差异

子离子	元素组成 MH ⁺	理论质量数 329.2587	测量离子的 精确质量数 329.2591	质量精 度误差 1.2 ppm	测量误差
229	C15H21N2	229.1699	229.1703	1.7	0.0252
229	C17H25	229.1951	229.1955	1.7	
189	C12H17N2	189.1386	189.1385	-0.5	0.0255
189	C14H21	189.1638	189.1640	1.1	
161	C10H13N2	161.1073	161.1068	-3.0	0.0249
161	C12H17	161.1325	161.1317	-5.0	
149	C9H13N2	149.1073	149.1072	-0.7	0.0248
149	C11H17	149.1325	149.1320	-3.4	
147	C9H11N2	147.0917	147.0914	-2.0	0.0255
147	C11H17	147.1168	147.1169	0.7	
135	C8H11N2	135.0917	135.0917	0.0	0.0252
135	C10H15	135.1168	135.1169	0.7	
119	C7H7N2	119.0604	—	—	
119	C9H11	119.0855	119.0856	0.8	
109	C6H9N2	109.0760	109.0761	0.9	0.0252
109	C8H13	109.1012	109.1013	0.9	
95	C5H7N2	95.0604	95.0604	0.0	0.0252
95	C7H11	95.0855	95.0856	1.1	
81	C4H5N2	81.0447	81.0449	2.5	0.0251
81	C6H9	81.0699	81.0700	1.2	
69	C3H5N2	69.0447	69.0448	1.4	0.0251
69	C5H9	69.0699	69.0699	0.0	
测量离子丢失					0.0252
相对标准偏差					0.0002
计算的中性丢失					0.0252

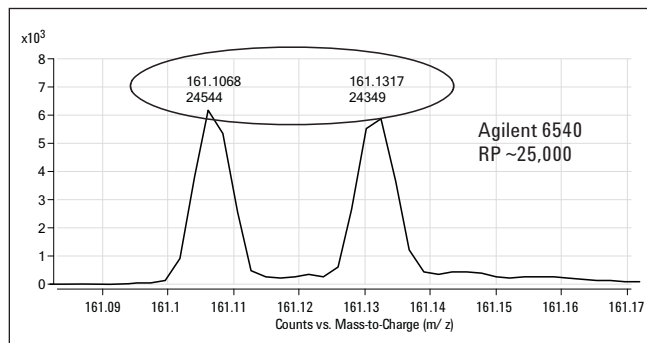


图 5. m/z 161 子离子是康力龙的同量异构子离子。安捷伦 6540 精确质量数 Q-TOF 液-质联用仪可轻易分离和鉴定这两个离子，每个子离子的鉴定点是 2.5

结论

总之，安捷伦 6540 精确质量 Q-TOF 液质联用系统在离子最大调谐质量 (m/z 2721.8948) 下的分辨率 (FWHM) 大于 40000。其同时也与快速色谱分离兼容，对最小的碎片离子分辨率可大于 20000 (FWHM)。这些性能特点可以用于食品中禁用兽药，如康力龙，的准确鉴别以及水中药物和抗生素的可靠分析。还定义了小分子鉴定所需的分辨率，满足欧盟关于高分辨质谱的要求。

参考

1. E. M. Thurman, I. Ferrer, J. A. Zweigenbaum, 2006, “高分辨精确质量数质谱用于食品中外源性物质的分析”, *Analytical Chemistry*, 78: 6703-6708
2. F. Hernandez, J. V. Sancho, M. Ibanez, 2009 Chapter 5, “使用 UHPLC-(Q)TOF MS 进行水中微量有机物的快速筛查分析”, *Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Ferrer, I. and Thurman, E.M., John Wiley & Sons, Inc., New York
3. E. M. Thurman, I. Ferrer, Chapter 2, “质量亏损、同位素分布以及精确质量数用于元素组成的测定”, *Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry*, Ferrer, I. and Thurman, E.M., John Wiley & Sons, Inc., New York
4. M. W. F. Nielen, M. C. van Engelen, R. Zuiderent, R. Ramaker, 2007 “精确质量数飞行时间液质联用仪、傅里叶变换质谱和轨道阱质谱用于激素残留检测的筛查和确认分析标准”, *Analytical Chimica Acta*, 586: 122-129
5. O. J. L 221/8 17.8.2002; Commission Decision 2002/657/EC.

更多信息

欲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

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus:cn

安捷伦客户服务中心：
免费专线：800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：customer-cn@agilent.com

在线询价：www.agilent.com/chem/quote:cn

www.agilent.com/chem/cn

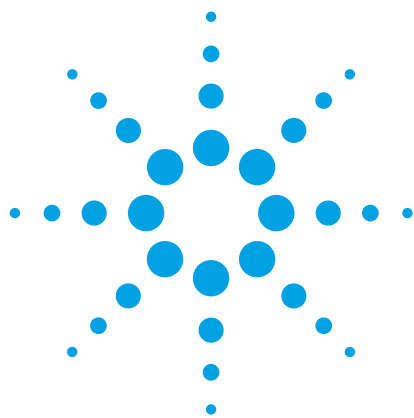
安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失不承担任何责任。

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，2010
2010年11月23日，中国印刷
5991-6430CHCN



Agilent Technologies



鉴定阿尔伯达湖水中的未知微囊藻毒素

应用简报

环境

作者

Ralph Hindle
Vogon 实验室服务有限公司
Cochrane, 阿尔伯达
加拿大

Xu Zhang 和 David Kinniburgh
阿尔伯达毒理学中心
阿尔伯达健康与保健中心
卡尔加里大学
卡尔加里, 阿尔伯达
加拿大

摘要

使用三重四极杆液质联用系统与 LC/Q-TOF 相结合进行分析并利用根据世界卫生组织 (WHO) 列出的微囊藻毒素名单编译的个人化合物数据库 (PCD), 在缺乏分析标准品的情况下实现湖水中浓度极低的未知微囊藻毒素的检测、表征和初步鉴定。



Agilent Technologies

前言

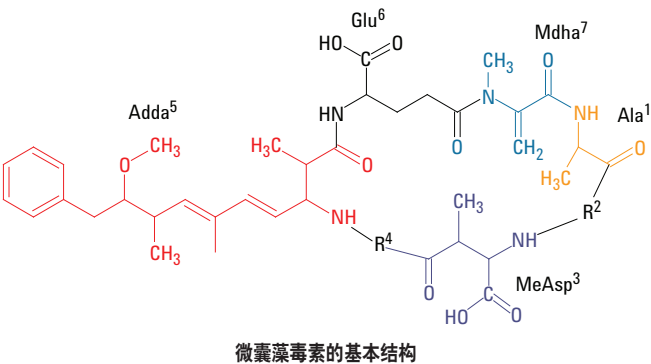
加拿大淡水中存在的蓝藻毒素严重影响了环境和公众的健康 [1]。微囊藻毒素 (MC) 是存在于加拿大湖泊中的一类常见的蓝藻毒素，是真核蛋白磷酸酶的有效抑制剂 [2]。微囊藻毒素还是一种强大的肝毒素，可能会促进哺乳动物体内肿瘤的生长，对家畜和人类饮用水具有严重的威胁。在加拿大的各省检出了这些蓝藻毒素，其浓度通常高于标准再生水的最高规定浓度 [2]。

MC 为含 7 种氨基酸的环肽。其基本结构如图 1 所示。表 1 显示了在阿尔伯达湖泊中检验到的 8 种微囊藻毒素的化学结构。最常报道的 MC 是 LR，在 R² 和 R⁴ 位置分别含有亮氨酸和精氨酸。

阿尔伯达毒理学中心 (ACFT) 对阿尔伯达湖泊中的微囊藻毒素进行了综合研究，并使用液相色谱和三重四极杆质谱继续对淡水水源进行监测。利用此方法检测 8 种微囊藻毒素的同时，还在样品中检出了一种非目标化合物，该化合物具有与 MC YR (*m/z* 1045) 相同的跃迁定性离子，但其保留时间 (RT) 和定性离子比值不正确。

本应用简报将介绍阿尔伯达毒理学中心 (ACFT) 和 Vagon 实验室服务部合作开发的两种方法，利用这两种方法能够灵敏地检测各种微囊藻毒素并鉴定出新观测到的化合物。使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统首次开发了一种确证方法，可获得不同于 ACFT 参考方法的保留时间图。然后，利用 Agilent 6540 Q-TOF LC/MS 系统测定精确质量数，从而对未知峰（如去甲基微囊藻毒素 HtyR）进行初步鉴定。

所有微囊藻毒素的检出浓度为 0.1 µg/mL，远低于 2007 年加拿大饮用水水质准则规定的 1.5 µg/L。安捷伦已根据世界卫生组织 (WHO) 列出的微囊藻毒素名单在 MassHunter 软件中创建了含 52 种化合物的个人化合物数据库 (PCD)，只需 Q-TOF 数据即可初步鉴定另外 7 种微囊藻毒素。



微囊藻毒素的基本结构		
位置	缩写	氨基酸
R ¹	Ala ¹	丙氨酸
R ²	Leu ² (L)	亮氨酸
R ³	MeAsp ³	甲基天冬氨酸
R ⁴	Arg ⁴ (R)	精氨酸
R ⁵	Adda ⁵	3-氨基-9-甲氧基-2,6,6-三甲基-10-苯基-4(E),6(E)-二烯酸
R ⁶	Glu ⁶	谷氨酸
R ⁷	Mdha ⁷	N-甲基脱氢丙氨酸

图 1. 微囊藻毒素 (MC) 的基本结构

表 1. 在阿尔伯达湖泊中检测到的 8 种微囊藻毒素*

微囊藻毒素	R ²	R ⁴	分子式	中性分子质量
LR	亮氨酸	精氨酸	C ₄₉ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₂	994.5488
去甲基 LR	亮氨酸	精氨酸	C ₄₈ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₂	980.5331
RR	精氨酸	精氨酸	C ₄₉ H ₇₅ N ₁₃ O ₁₂	1037.5658
YR	酪氨酸	精氨酸	C ₅₂ H ₇₂ N ₁₀ O ₁₃	1044.5280
LA	亮氨酸	丙氨酸	C ₄₆ H ₆₇ N ₇ O ₁₂	909.4848
LW	亮氨酸	苯丙氨酸	C ₅₄ H ₇₂ N ₈ O ₁₂	1024.5270
LF	亮氨酸	色氨酸	C ₅₂ H ₇₁ N ₇ O ₁₂	985.5161
HtyR	高酪氨酸	精氨酸	C ₅₃ H ₇₄ N ₁₀ O ₁₃	1058.5437

*微囊藻毒素的基本结构见图 1

实验部分

仪器

采用配有 Agilent G4226A 自动进样器的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统并结合 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统开发了此确证方法。表 2 中列出了仪器条件。

采用配有 G4226A 自动进样器的 1290 Infinity 液相色谱系统与配有喷射电喷雾离子源的 Agilent 6540B Q-TOF 液质联用系统开发了初步鉴定未知微囊藻毒素的方法。表 2 中列出了仪器条件。

表 2. 液相色谱和三重四极杆质谱的运行条件

液相色谱条件		
色谱柱	Agilent Poroshell SB-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685975-306)	
柱温	50 °C	
进样量	20 μL	
流动相	A) 1 mM 氟化铵的水溶液 (HPLC 级) B) 含 20% 异丙醇的乙腈溶液 (LC/MS 级)	
自动进样器温度	5 °C	
流速	0.6 mL/min	
梯度程序	时间 (min)	% B
	0	20
	3.0	30
	5.0	50
	6.0	100
停止	7 min	
后运行时间	2 min	
三重四极杆质谱条件		
电离模式	电离模式	
干燥气温度	350 °C	
干燥气流速	12 L/min	
雾化器压力	40 psig	
鞘气温度	400 °C	
鞘气流速	11 L/min	
鞘气流速	4000 V	
喷嘴电压	1000 V	
EMV	400 V	
四极杆飞行时间质谱条件		
模式	目标 MS/MS	
采集	棒状图和轮廓图; 2 GHz	
范围	100–1700 amu	
采集速率 (MS)	扫描 3 次/s	
采集速率 (MS/MS)	扫描 1 次/s	
扫描 1 次/s	121.0509 和 922.0098	

分析参数

6460 三重四极杆液质联用系统的多反应监测 (MRM) 分析参数如表 3 所示。

表 3. 使用三重四极杆液质联用系统进行目标化合物分析的 MRM 分析参数^a

微囊藻毒素	母离子 ^b (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 (V)
LR	995.6	135.2	80
		213.2	80
去甲基 LR	981.5	135.2	80
		213.2	80
RR	520.0	135.2	30
		213.2	40
YR	1045.5	135.2	80
		213.2	70
LA	910.5	135.2	70
		213.2	70
LY	1002.5	135.2	80
		213.2	70
LW	1025.5	135.2	80
		213.2	60
LF	986.5	135.2	70
		213.2	50
HtyR	1059.5	135.2	80
		213.2	70

^a 所有离子跃迁的碎裂电压和池加速电压分别为 150 V 和 2 V

^b 除 RR 带双电荷之外, 所有母离子均带单电荷

样品前处理

将水样 (10 mL) 进行 3 次冻融循环, 然后超声 5 min, 接着用 0.2 µm 纤维素滤膜直接过滤至自动进样器样品瓶中。

结果与讨论

鉴定未知微囊藻毒素

使用 ACFT 方法分析一个样品, 结果发现某化合物具有与 YR (m/z 1045) 相同的跃迁和定性离子, 但其保留时间 (RT) 和定性离子比值不正确。根据从 HtyR (m/z 1059) 损失的 14 amu 初步鉴定其为去甲基 HtyR。

为了定性鉴别这个未知 MC, 我们开发了三重四极杆液质联用确证方法, 从而获得了不同于 ACFT 参考方法的保留时间图。将其他微囊藻毒素分析物添加到此方法来帮助表征化合物。最后, 我们还使用 LC/Q-TOF 方法对样品进行分析以定性鉴别未知化合物。

确证方法

对三重四极杆液质联用确证方法进行优化以获得最低检测浓度约为加拿大饮用水水质准则 (CDWG) 规定浓度的 10%, 基于 MC LR, 准则规定浓度为 1.5 $\mu\text{g/L}$ 。本方法针对 MC YR、LR 和 RR 使用的校准品最低浓度为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 其他均为 0.2 $\mu\text{g/L}$ 。图 2 表明采用高效液相色谱法 (HPLC), 9 种 MC 在最低校准品浓度和接近 CDWG 的校准品浓度下达到完全分离。

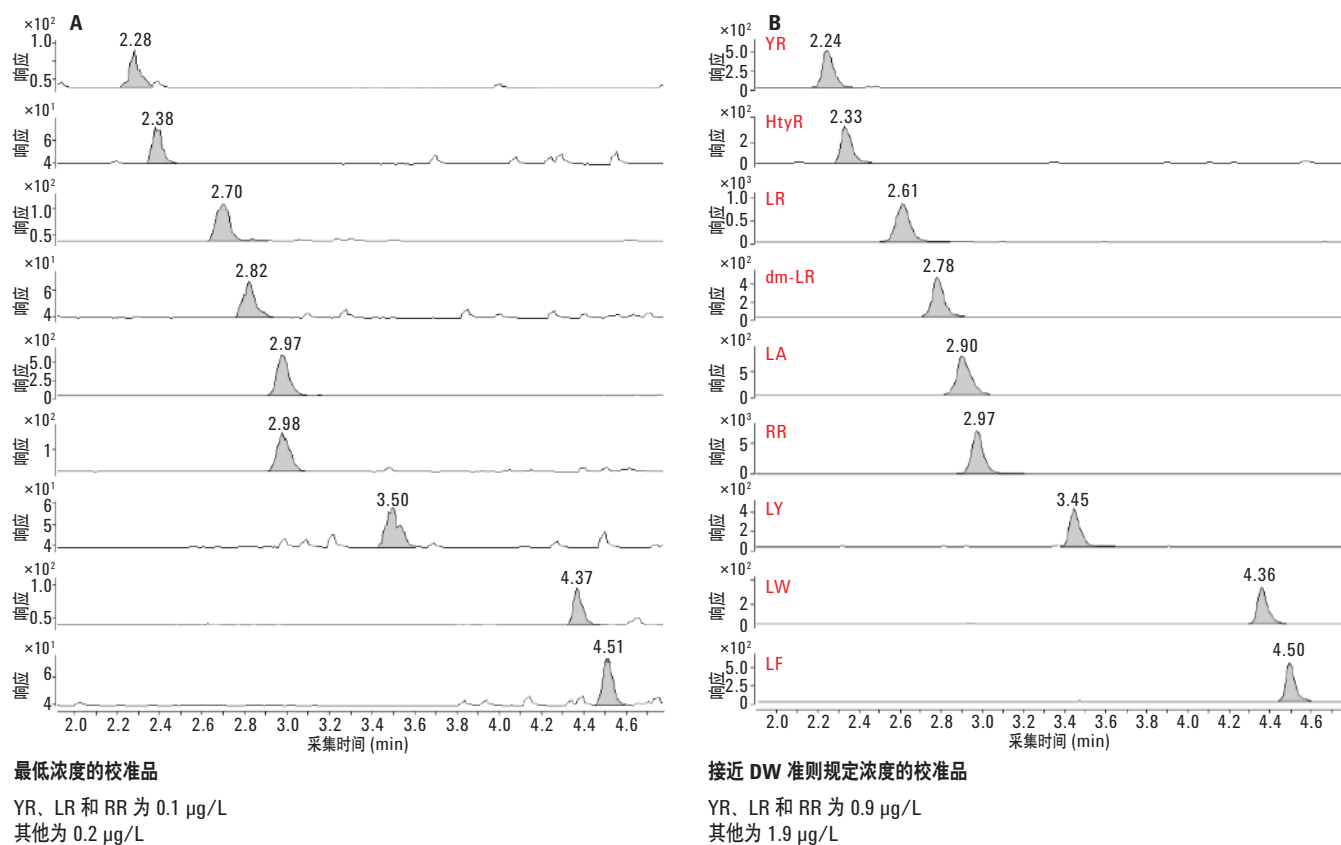


图 2. 浓度约为 2007 年 CDWG 规定浓度的 10% (A) 和 100% (B) 的 9 种微囊藻毒素的总离子色谱图 (TIC) 示例

最低校准品浓度为 0.2 µg/L 和最高校准品浓度为 50 µg/L 时，6 种 MC 的定量校准系数 (R^2) 良好，在 0.9978-0.9995 范围之内（表 4）。最低校准品浓度为 0.1 µg/L 和最高校准品浓度为 25 µg/L 时，3 种 MC 的 R^2 值为 0.9992-0.9997。如图 3 所示的 MC LR 代表性校准曲线说明即使在极低浓度下，线性仍良好。最低校准品浓度为 0.2 µg/L 时，6 种 MC 的准确度范围为 84% - 121%，最低校准品浓度为 0.1 µg/L 时，3 种 MC 的准确度范围为 110% - 119%（表 4）。

表 4. 校准系数和准确度（回收率）

校准范围	MC	R^2	准确度 ^a (%)
0.2 - 50 µg/L	Hty R	0.9995	95
	去甲基 LR	0.9993	84
	LA	0.9988	121
	LY	0.9998	92
	LW	0.9989	118
	LF	0.9978	119
0.1 - 25 µg/L	YR	0.9993	118
	LR	0.9997	110
	RR	0.9992	119

^a 所列为准品 1 的定量准确度（0.1 或 0.2 µg/L）

未知物分析

使用确证方法分析来自阿尔伯达湖泊水样的未知 MC，结果显示 MC 具有与 YR 相同的跃迁和定性离子峰，但其 RT 为 1.91 min，而非 2.24 min。并且定性离子比值 (m/z 213.2/135.2) 太低，因而不可能是 YR（2%，而 YR 为 24%）。低丰度峰 m/z 213.2 表明可能是 YR 结构中 N-甲基脱氢丙氨酸 (MDHA) 部分的去甲基化产物。然而，去甲基 HtyR 无市售品。因此，采用 Q-TOF 进行精确质量数分析以进一步确证去甲基化物的假设。

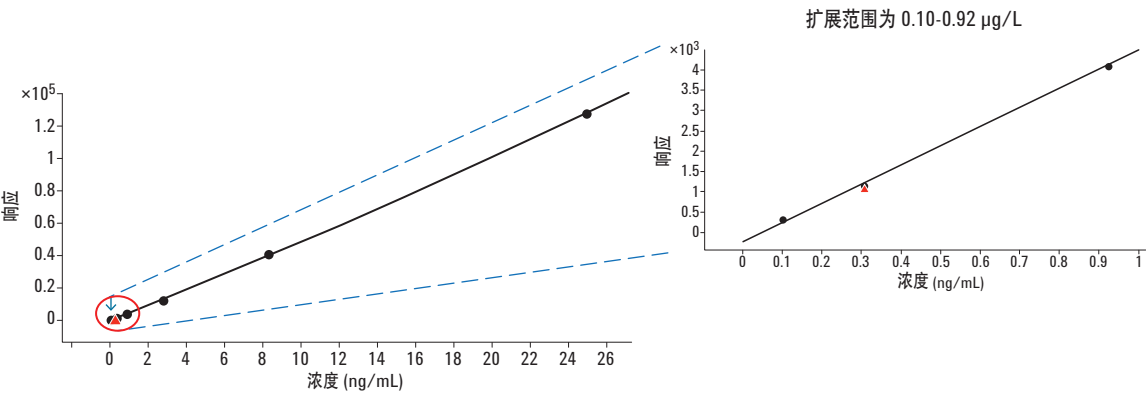


图 3. 经 3 倍连续稀释所得的浓度范围为 0.1 - 25 µg/L（包括 0.10 - 0.92 µg/L 的扩展浓度范围）的 MC LR 校准曲线表现出良好的线性

LC/Q-TOF 分析

使用液相色谱/Q-TOF MS (LC/Q-TOF) 测得的未知 MC 母离子的精确质量数为 1059.5500，与去甲基-HtyR 的实际质量数相匹配，质量数误差为 5.0 ppm。这进一步支持了未知物由 HtyR 去甲基化形成的假设。跃迁离子的检测结果显示未知物和 YR 均含两个标称质

量数为 m/z 135 的微囊藻毒素特征离子（图 4）。两个离子的实际质量数为 135.0804 和 135.1168，由 Adda 基团的不同片段图谱组成。两种微囊藻毒素中的这两种离子均得到良好分离，质量分辨率为 14000。

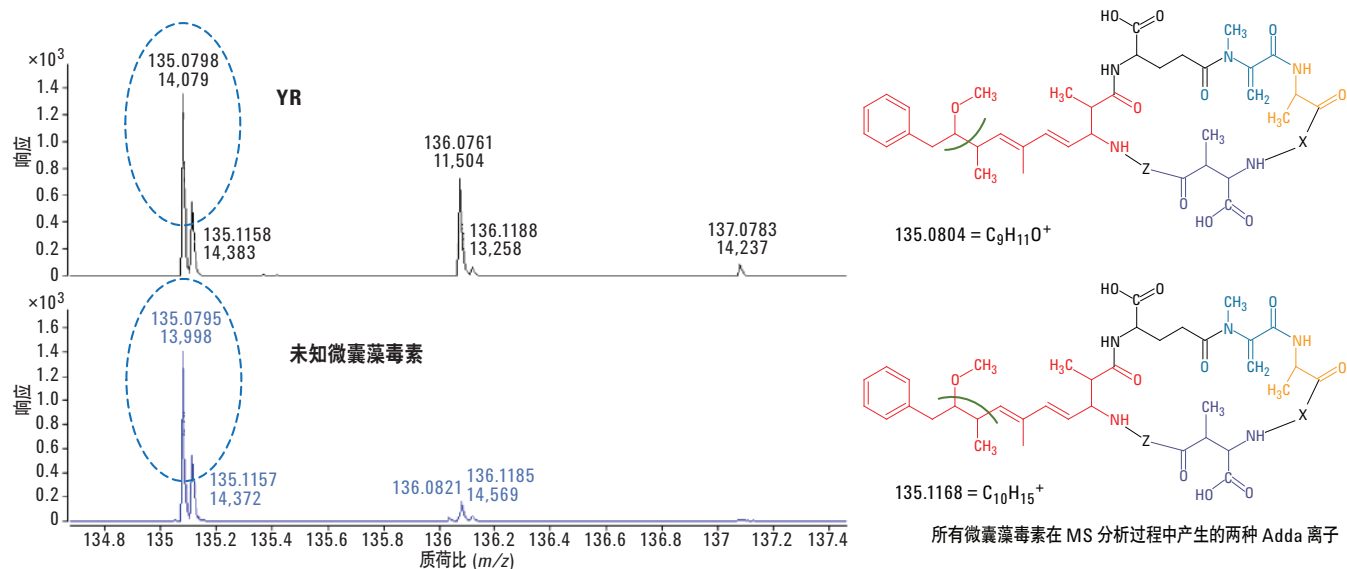


图 4. 使用 LC/Q-TOF 分析的谱图显示了从 Adda 基团衍生的两个离子和所有微囊藻毒素的特征离子，这些离子在 YR 和未知微囊藻毒素中均获得良好分离

然而，正如预期，在 MC YR 中存在由微囊藻毒素的 Glu + Mdha 基团裂解形成的 m/z 213 离子，但该离子在未知 MC 中仅以痕量浓度存在（图 5）。这表明未知 MC 并不是 YR。我们预期 Glu + Mdha 基团去甲基化生成精确质量数为 199.0713 的离子（图 6）。该离子可在未知 MC 的谱图中观察到，而在 MC YR 谱图中没有。这些结果也支持了未知 MC 为 dm-HtyR 的假设。

先前微囊藻毒素结构的 LC/MS/MS 表征确定了 8 个主要离子，指定为 a-h [3]。其中的两个离子（f 和 h）可用于鉴定未知 MC。离子 f 含有 R^7 和 R^2 部分（图 1），应分别为微囊藻毒素 dm-HtyR 的 dm-Mdha (Dha) 和 Hty。离子 h 含 R^2 部分，也可能是甲基化位点 MeAsp³。根据 R^7 和 R^2 的鉴定结果的不同以及 R^3 位置是否甲基化，这两种离子的精确质量数会有所不同并且可用于诊断微囊藻毒素结构。

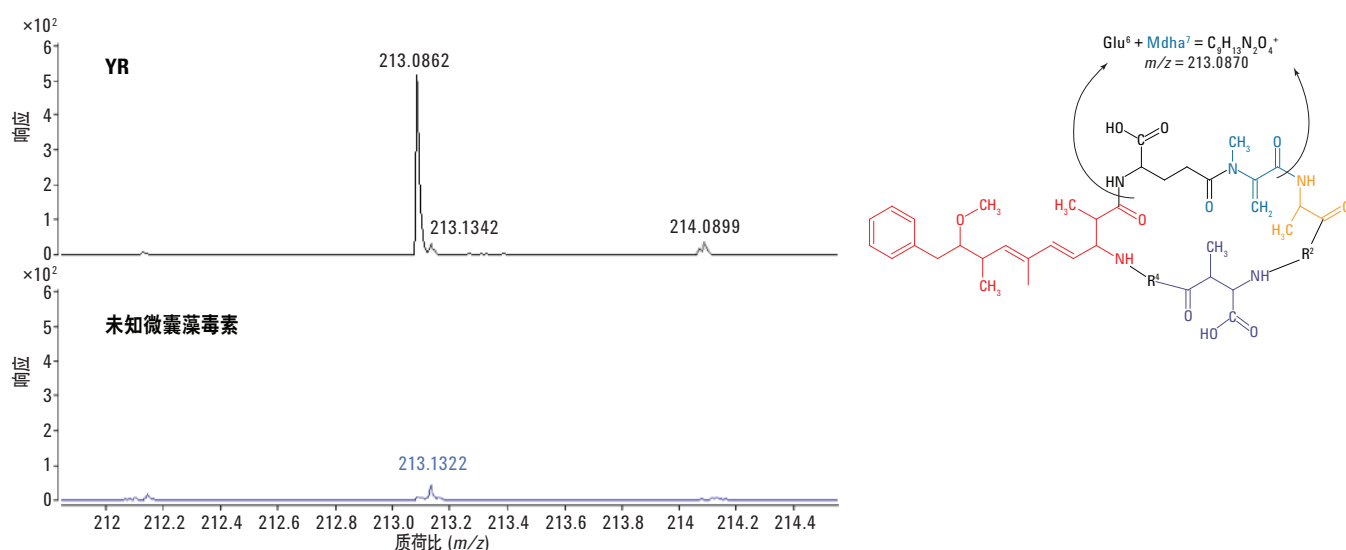


图 5. m/z 在 212-214.4 范围内的 YR 和未知微囊藻毒素的 Q-TOF 谱图。在微囊藻毒素 YR 中有 Glu + Mdha 基团的特征离子 m/z 213 存在，但在未知微囊藻毒素中的丰度较低

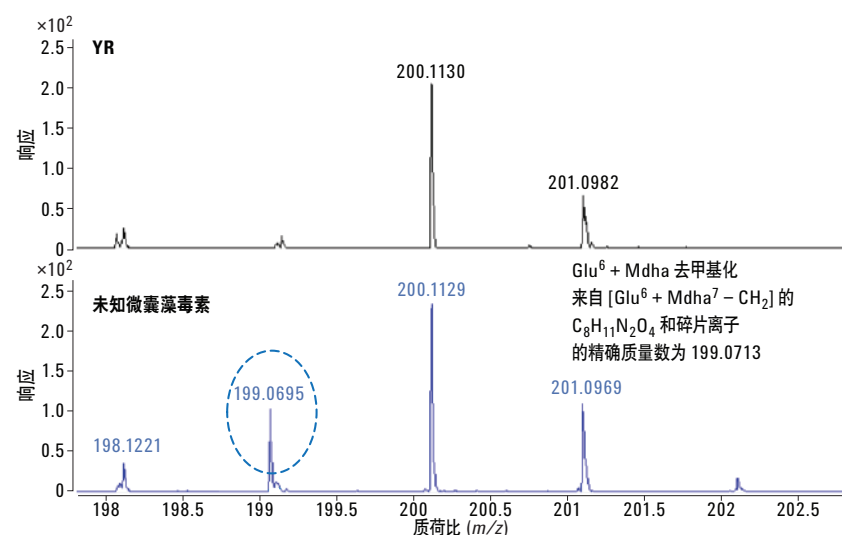


图 6. m/z 在 198-202 范围内的 YR 和未知微囊藻毒素的 Q-TOF 谱图。在未知微囊藻毒素谱图中存在峰 m/z 199，表明此物质为 Glu + Mdha 的去甲基化产物。此峰在 YR 中不存在。

采用 Q-TOF 分析未知微囊藻毒素中的离子 f 显示的精确质量数确证了第 7 位存在 Dha 和第 2 位存在 Hty，这与未知物为 dm-HtyR 的鉴定结果相符。分析 HtyR 标准品也同样得出了离子 f 的校正精确质量数（图 7）。

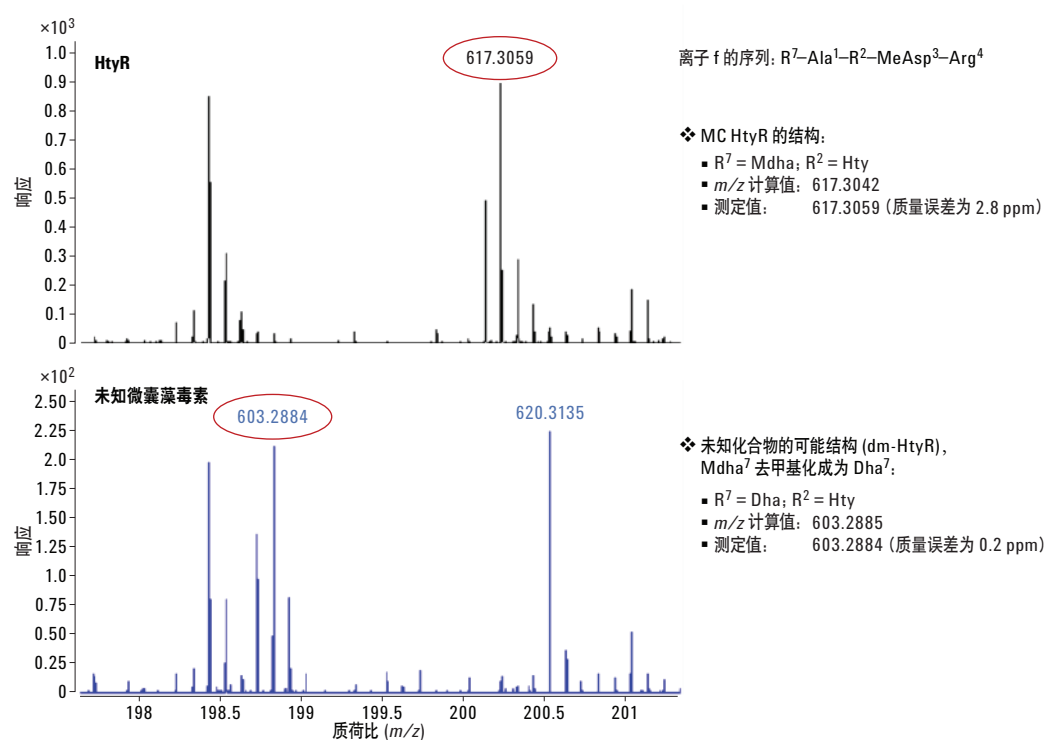


图 7. HtyR 和未知微囊藻毒素中离子 f 的 Q-TOF 谱图。在 HtyR（上方）中检测所得的离子 f 的精确质量数与含有第 7 位 Hty 和第 R^3 位 Mdha 的离子的质量数计算值相匹配。相反，在未知 MC 中检出的离子 f 的质量数与含有第 R^7 位 Hty 和第 R^3 位 Dha 的离子的质量数计算值相匹配

根据离子 h 的谱图确证了在未知 MC 的 R³ 位发生了最小程度的甲基化作用，因为其精确质量与计算得出的未知物和 HtyR 标准品第 3 位的甲基化天冬氨酸的精确质量数相匹配（图 8）。

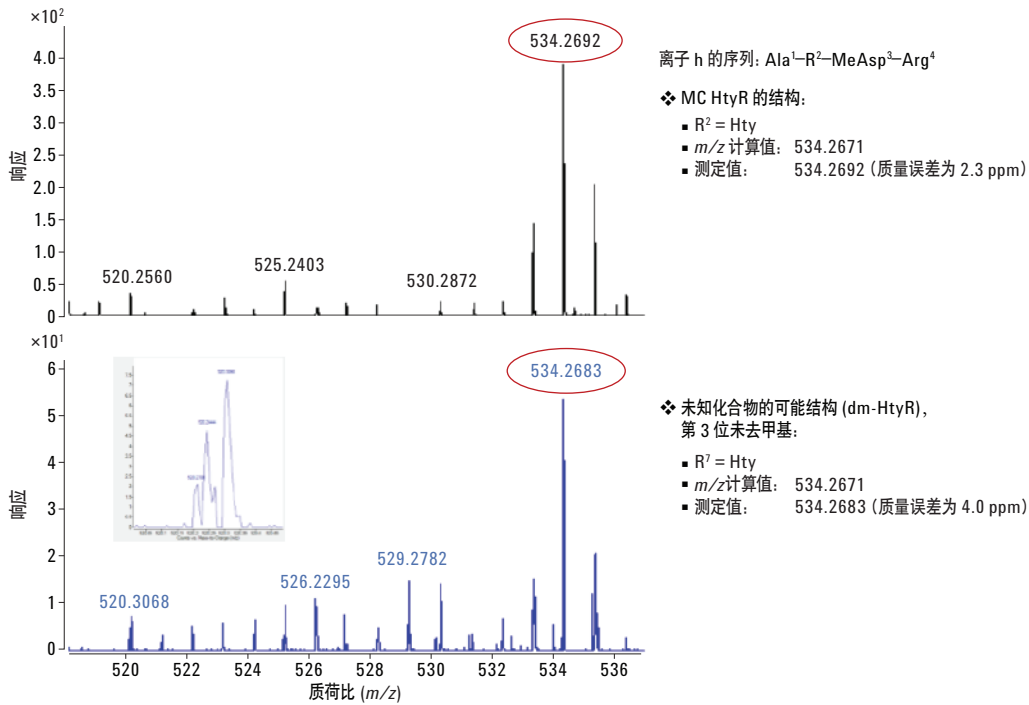
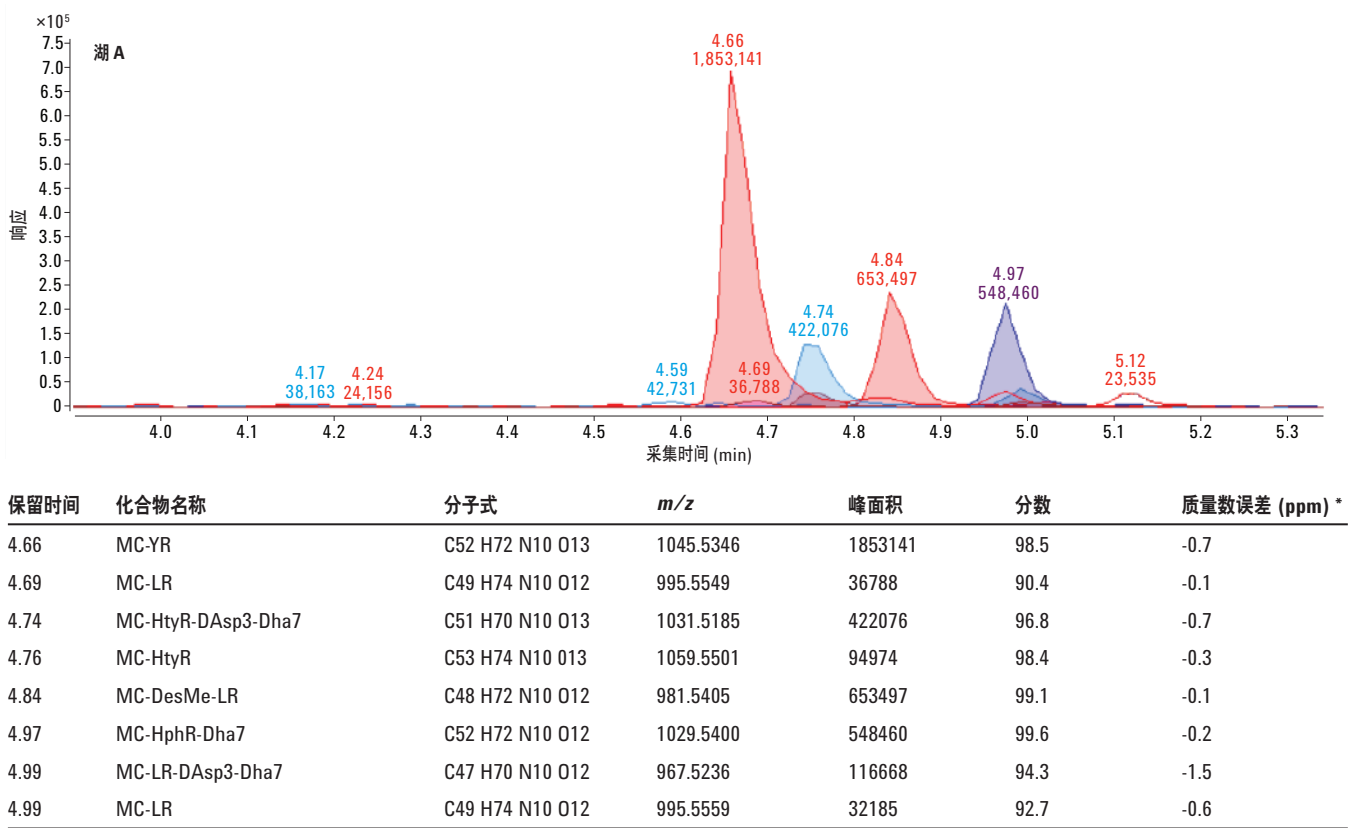


图 8. HtyR 和未知微囊藻毒素中离子 h 的 Q-TOF 谱图。在 HtyR（上方）和未知 MC 中检测所得的离子 h 的精确质量数与含有第 R7 位 Hty 和第 R³ 位 Mdha 的离子的质量数计算值相匹配。相反，检测结果显示在这两种微囊藻毒素中标称质量 m/z 520 处仅有一个极小的峰，这表明 R³ 位置很少或没有发生去甲基化。

使用个人化合物数据库鉴定多种未知微囊藻毒素

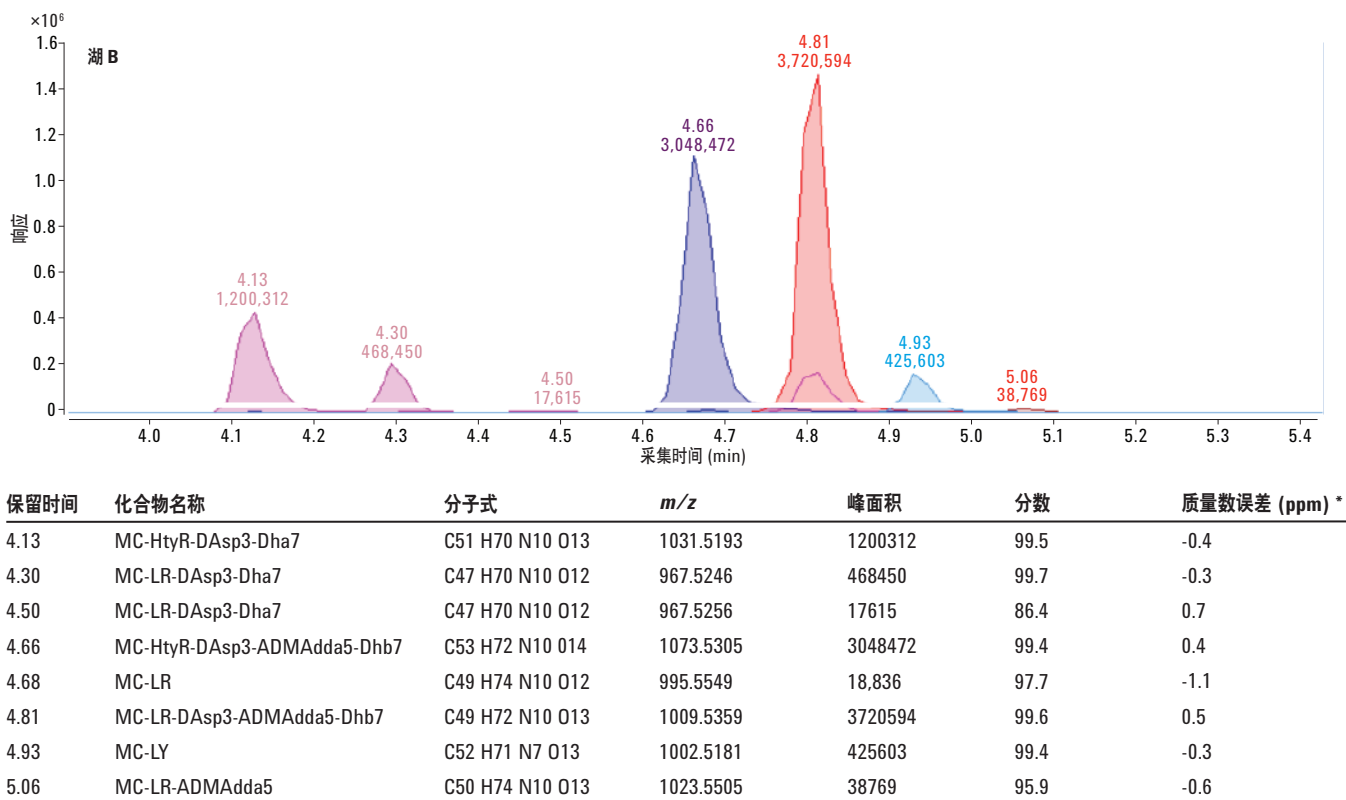
仅根据微囊藻毒素的 H+ 加合物，具备精确质量数分析能力的 Q-TOF 就可以初步鉴定阿尔伯达湖泊中可能存在的其他微囊藻毒素。这一过程的第一步是使用 Agilent MassHunter PCDL Manager 软件建立个人化合物数据库 (PCD)，该软件能够让用户创建和编辑定制的 PCD，包括化合物、精确质量数和保留时间信息。精确质量数扫描数据的优势之一是利用此数据库可以追溯检索已获得的新化合物数据。

在本研究中，根据 WHO 列出的微囊藻毒素名单 [4] 将 52 种微囊藻毒素的分子式输入到 PCD 中，生成 H+ 加合物的精确质量数。然后，利用 MassHunter 中的分子式查找工具在样品总离子色谱图 (TIC) 数据文件中检索这些加合物的精确质量数。采用此方法并结合 Q-TOF，还可初步鉴定湖 A 和湖 B 样品中除去甲基 HtyR 以外的 7 种未知物（图 9 和 10）。使用 Q-TOF MS/MS 进行额外分析并与分析标准品进行比较，以确证这些 MC 的存在并对其进行鉴定。我们将继续研究开发精确质量数计算器模型，以帮助鉴定非目标 MC 及其异构体。



*质量数误差的测定是利用 Q-TOF 分析得出的化合物质量数计算值减去其理论值，以 ppm 为单位

图 9. 取自湖 A 的水样的提取离子色谱图和表格，表格中包括了使用 MassHunter 分子式查找工具和针对 WHO 所列的各个微囊藻毒素创建的个人化合物数据库 (PCD) 初步鉴定所得的各个未知物的保留时间 (RT)、化合物名称、 m/z 计算值及质量计算值与理论值之间的差值。H+ 加合物鉴定的质量数误差为 5 ppm，最低匹配得分为 70



*质量数误差的测定是利用 Q-TOF 分析得出的化合物质量数计算值减去其理论值，以 ppm 为单位

图 10. 取自湖 B 的水样的提取离子色谱图和表格，表格中包括了使用 MassHunter 分子式查找工具和针对 WHO 所列的各个微囊藻毒素创建的个人化合物数据库 (PCD) 初步鉴定所得的各个未知物的保留时间 (RT)、化合物名称、 m/z 计算值及质量计算值与理论值之间的差值。H+ 加合物鉴定的质量数误差为 5 ppm，最低匹配得分为 70

结论

获得分析标准品后，使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统可为微囊藻毒素目标物分析提供一个很好的平台。利用 Agilent 6540 Q-TOF 液质联用系统进行三重四极杆液质联用分析，并根据分子离子加合物以及 MS/MS

碎片的精确质量数来确证疑似化合物。这两种技术相结合支持了阿尔伯达湖泊水样中存在 dm HtyR 的假设。使用 Agilent MassHunter PCDL Manager 软件对数据库进行编辑，使其包括根据文献中报道的类似物所得的其他微囊藻毒素的化学式。使用 MassHunter 分子式查找工具可以在 PCDL 数据库和谱库中追溯检索先前采集的数据文件以获取其他这些已知的化合物。

参考文献

1. B.G. Kotak, A.K.-Y. Lam, E. E. Prepas, and S.E. Hrudey. "Role of chemical and physical variables in regulating microcystin-LR concentration in phytoplankton of eutrophic lakes." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **57**, 1584–1593 (2000)
2. D. M. Orihel, D. F. Bird, M. Brylinsky, H. Chen, D. B. Donald, D. Y. Huang, A. Giani, D. Kinniburgh, H. Kling, B. G. Kotak, P. R. Leavitt, C. C. Nielsen, S. Reedyk, R. C. Rooney, S. B. Watson, R. W. Zurawell, and R. D. Vinebrooke. "High microcystin concentrations occur only at low nitrogen-to-phosphorus ratios in nutrient-rich Canadian lakes." *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **69**, 1457-1462 (2012)
3. T. Mayumi, H. Kato, S. Imanishi, Y. Kawasaki, M. Hasegawa, K. Harada. "Structural characterization of microcystins by LC/MS/MS under ion trap conditions." *J. Antibiot (Tokyo)* **59**, 710-719 (2006)
4. I. Chorus and J. Bartram (Eds.). "Toxic Cyanobacteria in Water—A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management. E & FN Spon, published on behalf of the World Health Organization, New York (1999)

更多信息

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

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 28 日，中国印刷
5991-4444CHCN



Agilent Technologies



GC/Q-TOF Workflow for Pesticide Residue Screening

Application Note

Pesticides

Authors

Klaus Wilmers, Peter Füst
Chemical and Veterinary Analytical
Institute
Münster, Germany

Samanta Uclés Duque,
Noelia Belmonte Valles,
Milagros Mezcua Peral and Amadeo
Fernández-Alba

Sofia Nieto and Philip Wylie
Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

Abstract

The first commercially available exact mass pesticide library for GC/Q-TOF has been developed by using three GC methods that employ backflush. A screening workflow using this library and the unique All Ions tools enables the detection of pesticide levels as low as 10 ppb in complex matrices.



Agilent Technologies

Introduction

Due to the complexity and variety of food matrices, a constantly growing interest in food safety, and an increasing list of pesticides, residue analysis has become a more complex task that requires high selectivity, sensitivity, and a high throughput approach for data analysis. State-of-the-art pesticide screening requires the consideration of more than 1,000 pesticides and their metabolites. Of these, as many as 600 to 800 compounds are included in routine monitoring programs. The increasing global emphasis on pesticide screening is reflected in the implementation of European Union (EU) guideline SANCO/12571/2013. The most recent revision specifies criteria for qualitative screening without the use of expensive standards for each pesticide in each batch of samples.

An accurate-mass approach in pesticide screening using quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF) offers more reliable pesticide identification, and allows for a virtually unlimited number of compounds to be screened simultaneously. Gas chromatography (GC) coupled to a Q-TOF mass spectrometer provides an ideal analytical tool that can be used to screen, confirm, and quantify trace levels of both target and unknown compounds, even in complex matrices.

This application note describes the creation of a curated GC/Q-TOF exact mass electron ionization (EI) library of pesticides and the development of an accurate mass pesticide screening workflow designed to help improve reliability and increase throughput of pesticide residue analysis. More than 740 EI spectra of pesticides were generated using the high-resolution Agilent 7890 GC, coupled to an Agilent 7200 Series GC/Q-TOF System.

This exact mass pesticide library enables efficient pesticide residue screening in the absence of standards. The workflow was tested using four different vegetable food matrices: tomato, onion, orange, and potato, spiked with 186 pesticides, as well as 136 pesticide residues spiked into catfish matrix. The database was supplied with three retention time (RT) data sets corresponding to the most common GC methods used for pesticide screening. An additional advantage of this approach is that, if required, the same data files can be further used for identification of unknown and untargeted pesticide residues later.

Experimental

Standards and reagents

The pesticide database was built using standards that were custom-made by Ultra Scientific. These pesticide mixtures were prepared at 100 parts per million (ppm) in acetone and methanol.

Instruments

This study was performed using an Agilent 7890B GC system coupled to an Agilent 7200 Series GC/Q-TOF System. The instrument conditions are listed in Table 1, and the instrument system configuration is shown in Figure 1.

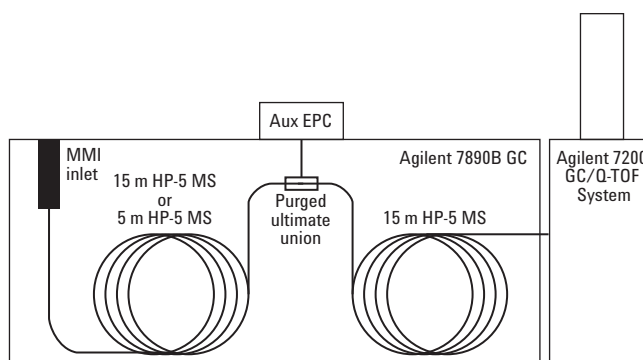


Figure 1. Agilent 7200 GC/Q-TOF System configuration using midcolumn backflush.

Sample preparation

QuEChERS sample preparation was used to extract pesticide residues from five different food matrices at four different concentrations to test the pesticide residue screening workflow.

Data processing and statistical analysis

Agilent MassHunter Qualitative Analysis (B.07, prerelease) Software tools were used to automatically convert accurate masses of fragment ions into theoretical (exact) masses for all abundant fragments in the spectrum, and to import the spectra into an exact mass pesticide Personal Compound Database Library (PCDL). The All Ions tool in MassHunter Qualitative Analysis Software was used for pesticide screening.

Table 1. Agilent 7890 GC and Agilent 7200 GC/Q-TOF Mass Spectrometer Conditions

GC and MS conditions	Method 1	Method 2	Method 3
Column flow	Constant flow mode	Constant flow mode	Constant flow mode
Columns	HP-5 MS UI, 15 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm film (two each)		HP-5 MS UI, 5 m and 15 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm film
RT of Locking compound (Chlorpyrifos-methyl)	18.111 minutes	9.143 minutes	8.524 minutes
Carrier gas	Helium	Helium	Helium
Inlet temperature	280 °C	280 °C	280 °C
Injection mode	Splitless	Splitless	Splitless
Injection volume	1 µL	1 µL	1 µL
Oven temperature program	60 °C for 1 minute 40 °C/min to 120 °C, 0 minutes 5 °C/min to 310 °C, 0 minutes	60 °C for 1 minute 40 °C/min to 170 °C, 0 minutes 10 °C/min to 310 °C, 0.3 minutes	60 °C for 1.5 minutes 50 °C/min to 160 °C, 0 minutes 8 °C/min to 240 °C, 0 minutes 50 °C/min to 280 °C, 2.5 minutes 100 °C/min to 290 °C, 3.1 minutes
Run time	40.5 minutes	20.75 minutes	20 minutes
Backflush	5 minutes (Post-run)	5 minutes (Post-run)	5 minutes (Post-run)
Transfer line temperature	280 °C	280 °C	280 °C
Ionization mode	EI	EI	EI
Source temperature	280 °C	280 °C	280 °C
Quadrupole temperature	180 °C	180 °C	180 °C
Mass range	45 to 550 <i>m/z</i>	45 to 550 <i>m/z</i>	45 to 550 <i>m/z</i>
Spectral acquisition rate	5 Hz, collecting both in centroid and profile modes	5 Hz, collecting both in centroid and profile modes	5 Hz, collecting both in centroid and profile modes

Results and Discussion

GC/Q-TOF using a backflush configuration

Backflush is used in the pesticide screening workflow to reduce background and increase chromatographic resolution and sensitivity, while decreasing the analysis time. Using this technique, late eluting, higher boiling substances are flushed out of the inlet split flow vent instead of driving them through the entire length of the column into the mass spectrometer. This approach reduces accumulated chemical noise due to carryover and increases throughput. System uptime is also increased, due to reduced maintenance of the columns and MS detector.

A quick and simple backflush approach is to use a Capillary Flow Technology device in the middle of the analytical column (Figure 1). In this case, instead of using one column, two 15-m columns (Methods 1 and 2), or a 5-m and a 15-m column (Method 3) were used and connected by an ultra-low dead volume Purged Ultimate Union, using an Auxiliary Electronic Pressure Control (Aux EPC) Module to carry out the backflush procedure (Figure 1).

Construction of the curated exact mass pesticide library

High resolution and mass accuracy are required to acquire the high-quality spectra for construction of a useful exact mass pesticide spectra library. As seen in Figure 2, two fragment ions can appear as one peak in unit mass instruments, but can easily be resolved using the GC/Q-TOF.

The concept of Personal Compound Databases and Libraries (PCDLs) is part of an integrated system for confident identification through either accurate or exact mass MS or MS/MS information stored in your own customizable PCDLs. This includes the theoretical mass of the molecular ion, RT, and miscellaneous compound information, as well as accurate mass fragment spectra. This concept has been used to create an exact mass pesticide PCDL for EI spectra.

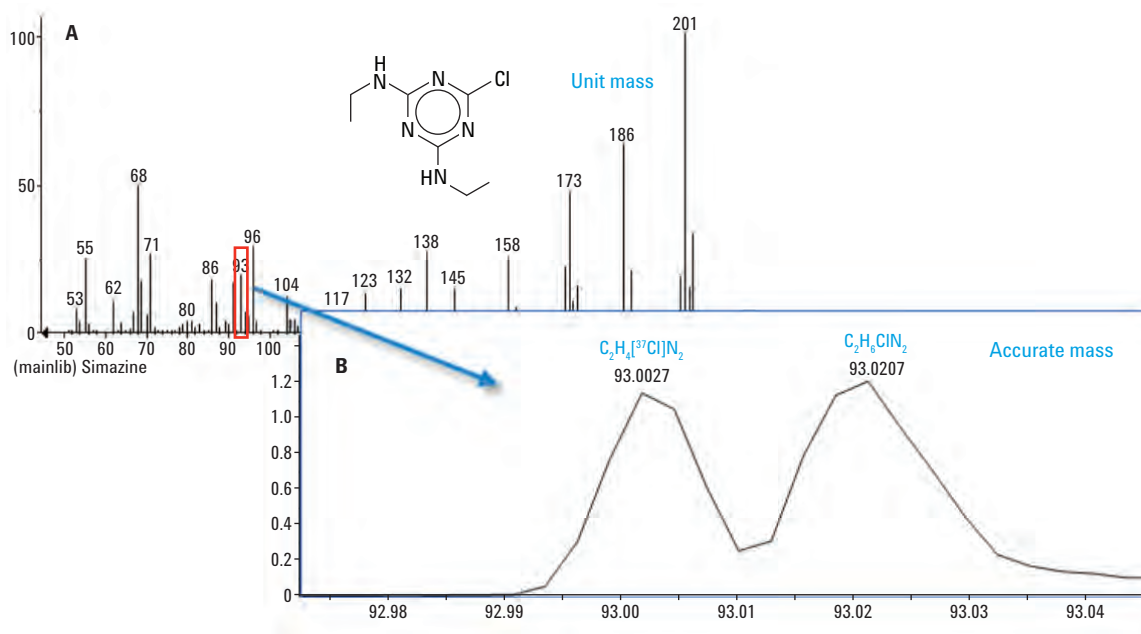


Figure 2. The $C_2H_4[^{37}Cl]N_2$ and $C_2H_6ClN_2$ fragment ions are seen as one peak in unit mass instruments (A), but can easily be resolved with the Agilent 7200 GC/Q-TOF System (B).

The annotation of the EI fragments was performed using accurate mass information from TOF EI spectra, which were processed using the Molecular Formula Generator (MFG) and Fragment Formula Annotation (FFA) tools in the prereleased version of MassHunter Qualitative Analysis Software B.07 (Figure 3).

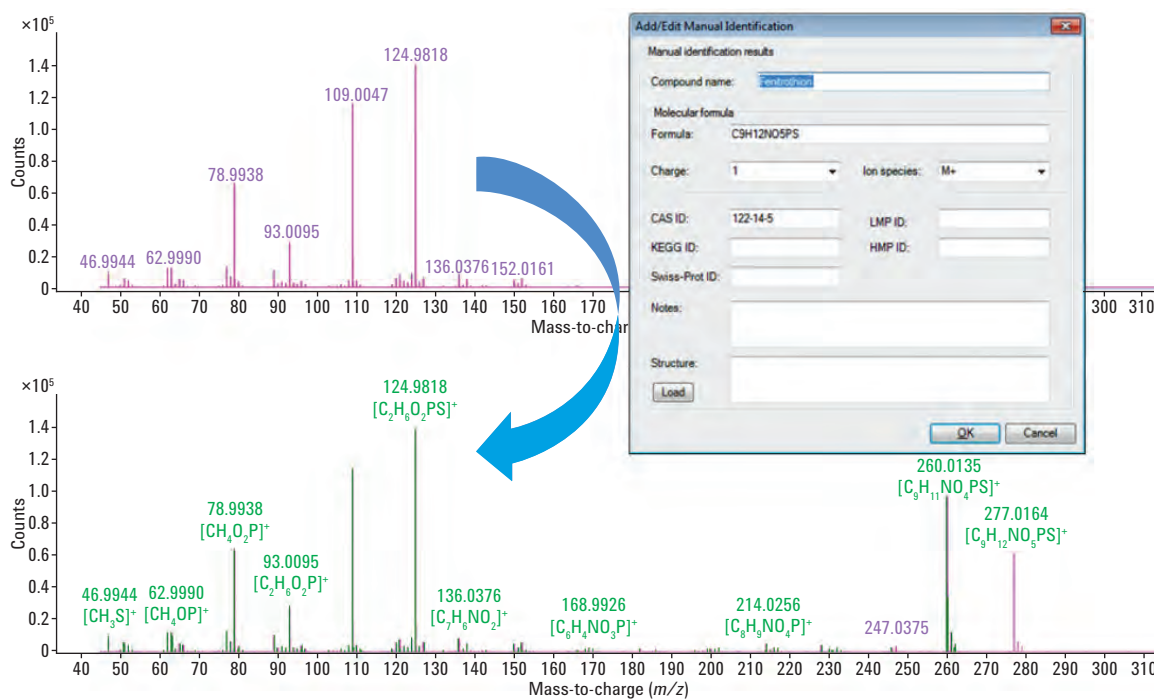


Figure 3. FFA of the spectrum using Agilent MassHunter Qualitative Analysis. Fragment formulas were assigned based on the empirical formula of the pesticide residue and accurate mass spectral data. Annotated fragments are colored in green. The molecular ion and its isotopes are colored in pink.

After the fragment annotation was performed, the theoretical masses of the fragments were automatically calculated, and the corrected spectra were directly imported into a PCDL (Figure 4). The spectra of approximately 740 pesticide standards were acquired using three different RT locked GC methods to enable flexibility in the GC configuration. These were then imported directly into the PCDL. The observed mass accuracy of the library was within 2 ppm, and the average error of the isotopic abundances was below 1 %, enabling accurate annotation of the fragment ions with the formulae. This is the first commercially available exact mass pesticide library for GC/Q-TOF.

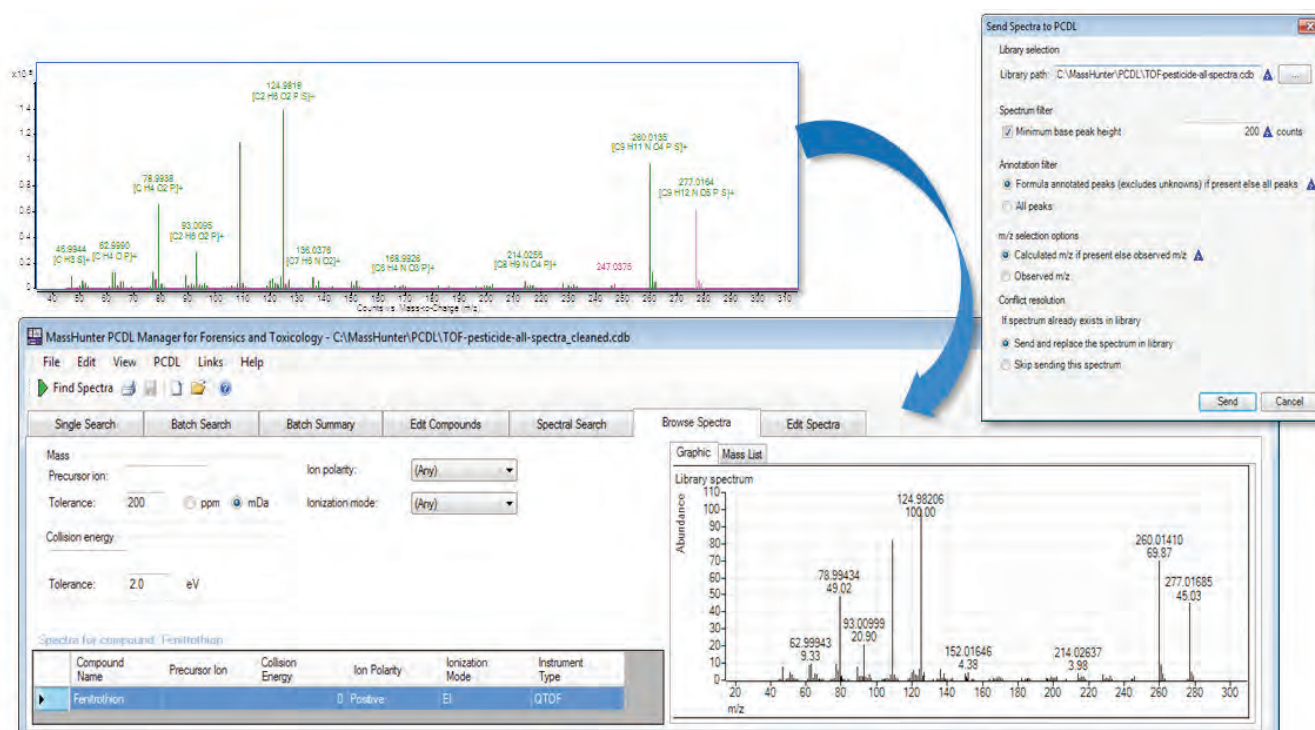


Figure 4. The theoretical (exact) masses of the annotated fragments in the spectrum were imported directly into the PCDL.

Pesticide screening workflow using the All Ions tool

The All Ions technique applied to GC/Q-TOF data makes use of the coelution of the diagnostic reference and qualifier ions generated during EI to ensure accurate identification. The All Ions tool is an extension of the unique Find by Formula (FBF) algorithm in MassHunter Qualitative Analysis Software, and is the same tool as All Ions MS/MS used for pesticide screening with LC/Q-TOF. Unlike the latter, the All Ions tool used with GC/Q-TOF considers the molecular ion in the spectrum to be optional, and its absence is not penalized.

The EICs of the most specific EI fragments in each PCDL spectrum are extracted and evaluated using a unique coelution score parameter. The software calculates a number based on abundance, peak shape (symmetry), peak width, and RT. Figure 5 provides an example of overlaid EICs for the ions derived from sebumeton in tomato extract. All ions have the same chromatographic apex and shape, suggesting that they originated from the same compound. The normalized ratios of the fragment ions to the reference ion intensity are plotted across the RT and made available to the user for inspection in a Coelution Plot (Figure 5). If all ions exhibit a ratio of approximately 1 across the middle of the reference ion peak, as in this example, there is strong confirmation that the fragments belong to the same compound.

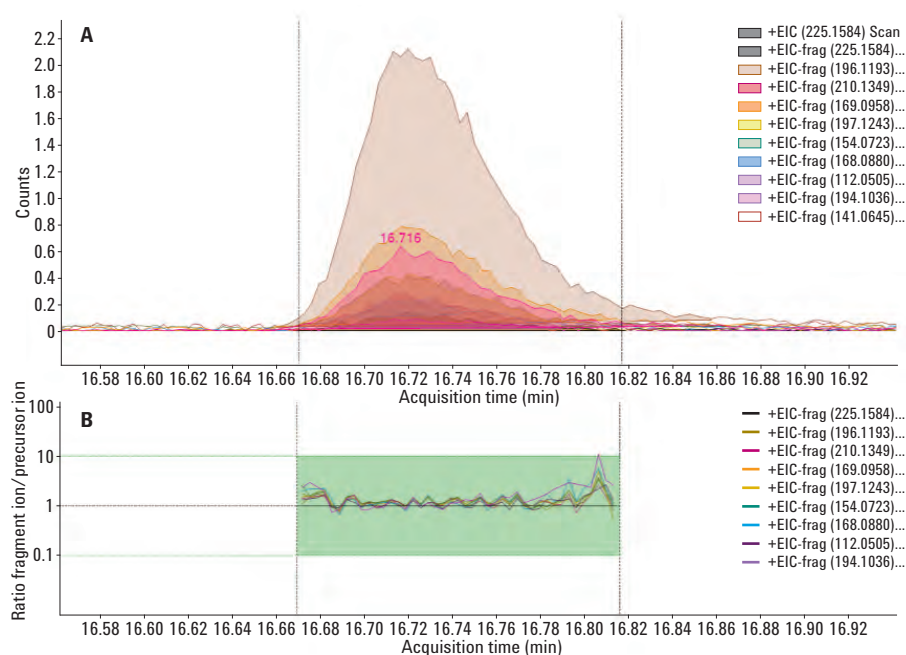


Figure 5. A) Overlaid EICs for sebumeton in tomato extract, with the reference ion in grey and qualifying ions in other colors. All ions have the same chromatographic apex. B) Coelution plot for sebumeton. All fragment ions exhibit ratios of approximately 1 across the middle of the precursor peak, indicating strong coelution. This provided confirmation for the identification of sebumeton in the sample.

It is possible to inspect All Ions results quickly, scrolling through all compounds in the screen, and efficiently viewing the compound results table, identification details, overlaid EICs, the Coelution Plot, as well as spectrum results (Figure 6). The flexibility of the All Ions tool settings can allow the user to fine-tune it for the specific application by selecting the desired number of qualifying ions, coelution score, mass extraction window, and other parameters. In addition, RT locking ensures precise identification of the pesticides.

At this point, the user will have developed a qualitative method for the identification of compounds using the All Ions technique. New compounds can easily be added to the screen by addition to the PCDL followed by data reprocessing. This important capability provides simple subsequent data re-interrogation for additional compounds without sample reanalysis.

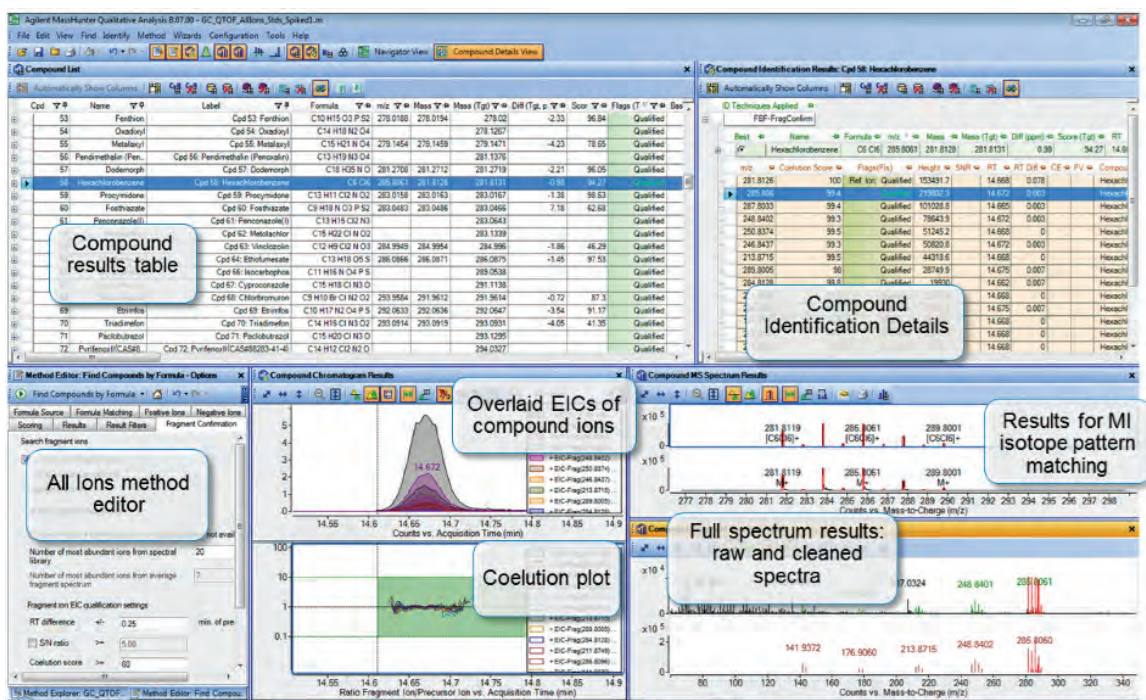


Figure 6. All ions tool results overview for pesticides spiked into tomato extract.

Validating the workflow

Using the pesticide PCDL and the All Ions workflow, four different vegetable matrices (tomato, onion, orange, and potato) were spiked with 186 pesticides at levels of 20 ppb to 100 ppb. More than 80 % of the residues were detected in each vegetable extract at a concentration of 20 ppb. In addition, the All Ions workflow has been tested with catfish, a dirty matrix that contains a very large number of compounds that can make it difficult to detect low levels of pesticides. However, 86 % of 136 pesticides were detected using this screening method when spiked into catfish matrix at 10 ppb (Figure 7).

Conclusions

The accurate mass power of the Agilent 7200 GC/Q-TOF System has enabled the development of the first commercially available exact mass pesticide library for GC/Q-TOF. A screening workflow using the unique All Ions tool has also been used successfully to screen for pesticide residues in five different food matrices.

For More Information

These data represent typical results. For more information on our products and services, visit our Web site at www.agilent.com/chem.

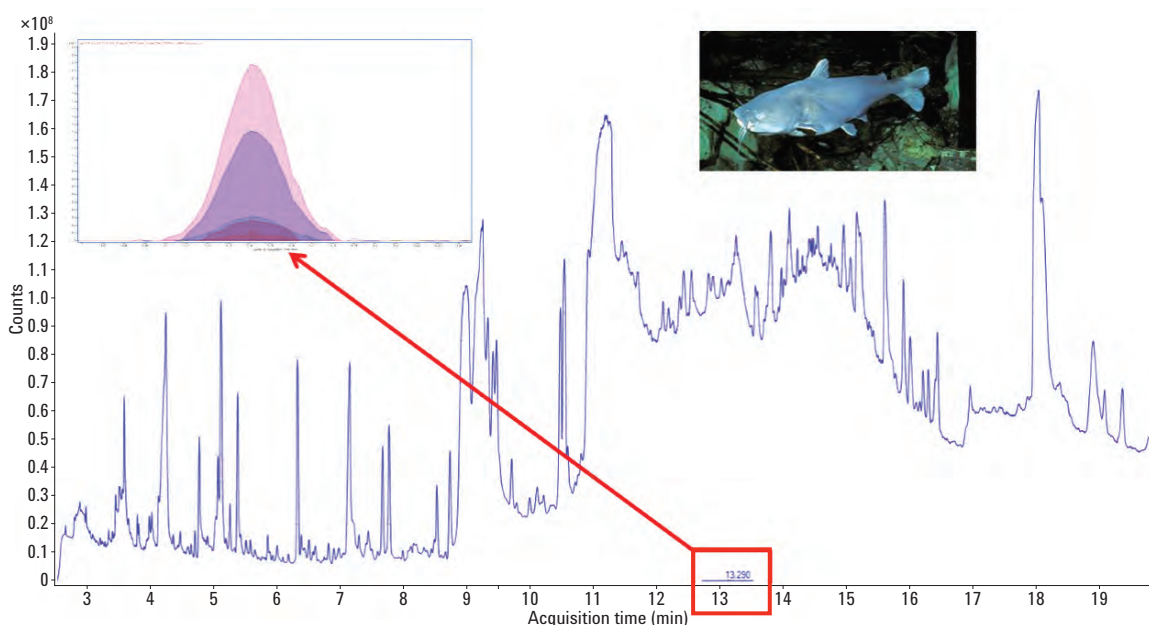


Figure 7. Total ions GC chromatogram (TIC) from a catfish extract spiked with pesticide residues at 10 ppb. The EIC overlay shows the location of *p,p'*-DDT, and the coelution pattern confirms its identity.

www.agilent.com/chem

Agilent shall not be liable for errors contained herein or for incidental or consequential damages in connection with the furnishing, performance, or use of this material.

Information, descriptions, and specifications in this publication are subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
Printed in the USA
October 10, 2014
5991-5254EN



Agilent Technologies



使用 Agilent 7200 系列 GC/Q-TOF 系统对气溶胶颗粒上的半挥发性有机化合物 (SVOC) 进行筛选

应用简报

环境

作者

Tingting Xu 和 Xiang Li
复旦大学
中国上海

Shifen Xu
安捷伦科技(上海)有限公司
中国上海

Kai Chen
安捷伦科技公司
Santa Clara, CA

摘要

气溶胶颗粒上吸附的有机化合物组成能够为气雾剂的空气污染研究提供重要线索。将 Agilent 7200 系列精确质量数 GC/Q-TOF MS 的全采集电子电离 (EI) 模式与 Agilent MassHunter 软件工具相结合, 能够得到一种用于筛选复杂颗粒提取物中多种化合物的非靶向工作流程。使用 EI-MS/MS 功能根据子离子碎片的精确质量数来研究未知化合物的结构。



Agilent Technologies

前言

半挥发性有机化合物 (SVOC) 具有多种分子结构，与气溶胶颗粒的形成及其对健康的影响息息相关 [1,2]。由于人们对微小气溶胶颗粒引起污染的关注度日益增长，且颗粒吸附的有机化合物日益多样化，因此 SVOC 的筛选成为了一项要求日益严格的复杂任务，需要采用高选择性、高灵敏度的非靶向工作流程进行数据分析。

一种使用四极杆飞行时间质谱 (Q-TOF) 分析气溶胶颗粒有机物含量的精确质量数方法提供了更可靠的鉴定结果，并能够同时筛选几乎无限数量的 SVOC。它提供的理想分析工具可用于筛选和确证复杂气溶胶颗粒提取物中的目标化合物及未知化合物。

本应用简报展示了一种使用高分辨率 Agilent 7200 系列 GC/Q-TOF 系统对气溶胶颗粒上吸附的 SVOC 进行非靶向筛选的工作流程。采用通过 NIST 标称质谱库搜索的解卷积质谱图获得化合物匹配结果。利用分子离子或碎片离子的精确质量数确证化合物分子式。GC/Q-TOF 系统的另一个优势是能够在 MS/MS 模式下运行以研究未知化合物的结构。

实验部分

仪器

采用 Agilent 7890B 气相色谱系统与 Agilent 7200A Q-TOF 系统联用开展研究。仪器配置如图 1 所示，仪器条件列于表 1 中。气相色谱运行中启用了保留时间锁定 (RTL) 功能以及安捷伦农药与环境污染物 (P&EP) MRM 数据库 3.0（部件号 9250AA）中包括的恒流柱中反吹筛选方法。

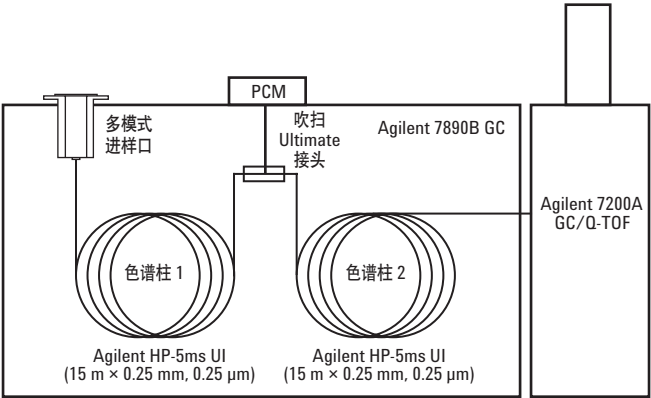


图 1. 显示柱中反吹的 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统配置。将 Agilent 7890B GC 与 Agilent 7200A Q-TOF 进行了联用

表 1. Agilent 7890B 气相色谱与 Agilent 7200A GC/Q-TOF 质谱的仪器条件

气相色谱条件	
色谱柱	Agilent HP-5ms UI 柱, 15 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm (各两根)
载气	氦气
色谱柱 1 流量	1.0 mL/min
色谱柱 2 流量	1.2 mL/min
进样口温度	280 °C
进样模式	不分流
进样量	2 μL
柱温箱升温程序	60 °C 下保持 1 min, 以 40 °C/min 升至 120 °C, 保持 0 min, 以 5 °C/min 升至 310 °C, 保持 10 min
运行时间	50.5 min
反吹	5 min (后运行)
传输线温度	310 °C
Q-TOF MS 条件	
电离模式	EI
离子源温度	300 °C
四极杆温度	180 °C
质量范围	50 - 500 m/z
谱图采集速率	5 Hz, 以棒状图和轮廓图两种模式采集

样品前处理

使用采样器（中国广州）在 300 L/min 的流速下，将气溶胶颗粒 (PM_{2.5}) 采集到石英纤维过滤器 (QFF, Whatman, 5 英寸 × 8 英寸) 上。在采样前后，将 QFF 置于 20 °C 和相对湿度 (RH) 40% 的恒温恒湿洁净室中平衡 24 小时。采用灵敏度达 0.001 mg 的电子微量天平 (Sartorius, IL, US) 测定各个 QFF 上的颗粒质量。用 50 mL 二氯甲烷/己烷 (1:1, v/v) 在 7 °C 下对滤液（一半）索氏提取 48 小时。用过滤器装置对提取物进行过滤。提取物经旋转蒸发器浓缩后，在纯 N₂ 流下进一步浓缩至 2 mL，溶剂替换为正己烷。

数据分析

在数据处理时，使用 Agilent MassHunter 定量分析软件 (B.07.01) 中的未知物分析工具进行色谱峰解卷积，然后通过 NIST 14 质谱库进行对比来鉴定化合物。利用精确质量数信息和 MassHunter 定性分析软件 (B.07.01) 中的精确质量数工具进一步确证解卷积峰的归属。使用分子结构关联 (MSC) 软件进一步研究初步鉴定出的化合物结构。

结果与讨论

色谱峰解卷积和谱库搜索

使用未知物分析软件中的色谱峰解卷积进行数据处理，为找到尽可能多的化合物，将精确质量提取窗口设置为 100 ppm，并将可变保留时间窗口大小因子设置为 50 - 200（图 2）。根据与 NIST 谱库比较得到的匹配因子得分 > 50 的结果鉴别出大约 2600 种化合物，其中包括烷烃类、萘类、酮类、多环芳烃 (PAH)、含氧多环芳烃 (O-PAH)、酯类和杂环化合物。利用分子式生成器和分子式计算工具对通过解卷积找到的每种化合物的归属进行确证。PAH 和 O-PAH 的筛选结果示例如下文所示（图 3 和图 4）。类似的工作流程可应用于筛选其他类别的化合物。

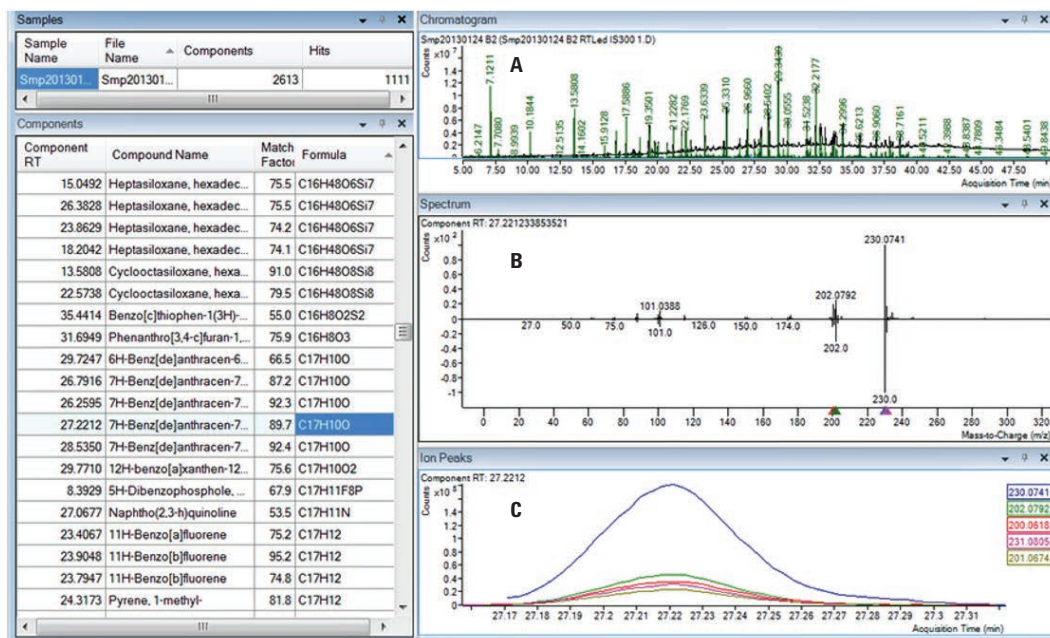


图 2. 用于进行色谱柱解卷积的未知物分析软件。图中显示了总离子流色谱图 (TIC) (A)、组分和谱库匹配谱图的镜像图 (B) 以及组分的叠加提取离子谱图 (EIC) (C)

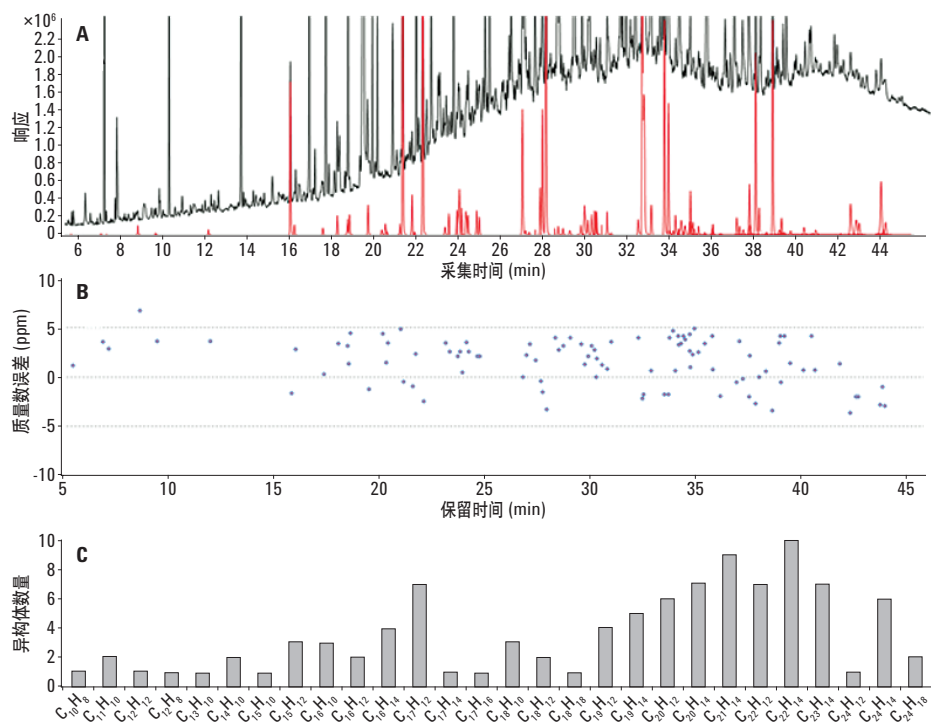


图 3. PAH 的筛选结果。色谱图 (A) 叠加了 TIC (黑色) 和已鉴定 PAH 的组分图谱 (红色)，而通过分子式计算器计算得到的已鉴定 PAH 分子离子的质量数误差显示于图 B 中，分子式分布显示于图 C 中

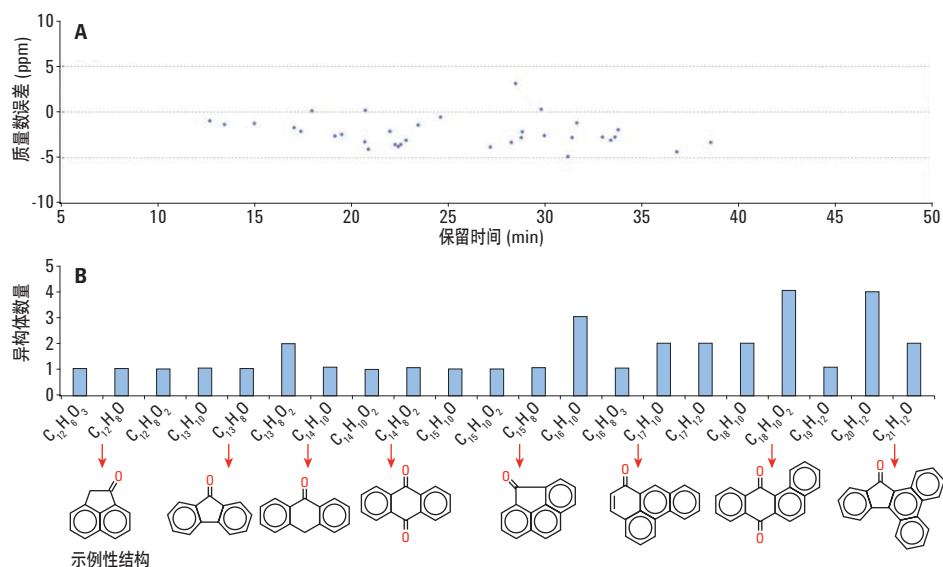


图 4. 利用精确质量数信息确认 O-PAH。使用分子式计算器计算得到的已鉴定 O-PAH 的分子离子质量数误差显示于图 A 中，而分子式分布和示例性结构显示于图 B 中

PAH 和 O-PAH 的鉴定

未知物分析能够鉴定与未分离的复杂混合物共流出的大量 PAH，如图 3 所示。精确质量数信息可用于确证大约 100 种 PAH，质量数误差小于 5 ppm。P&EP MRM 数据库包含若干 PAH 的保留时间 (RT)，利用该数据库可进一步确证匹配结果。数据库与样品之间的 RT 差值均处于 0.03 分钟的窗口内。良好的 RT 匹配结果进一步验证了精确质量数信息可用作确证工具。分子式分布显示气溶胶颗粒的提取物中存在各种 PAH，这些化合物含有 10 - 28 个碳原子。

同样，在气溶胶颗粒的提取物中也鉴定出了 O-PAH，通过精确质量数信息确认了其中 34 种组分。图 4 显示了所有鉴定出的 O-PAH 的质量数误差和分子式分布。一些典型 O-PAH 的结构也显示于图 4 中。

利用 MS/MS 给出未知化合物的结构

色谱峰解卷积能够发现未知化合物，如图 5 所示。NIST 谱库中与这一谱图最接近的匹配结果是蒽并[1,9-cd]吡啶-6(2H)-酮，其分子式为 $C_{14}H_8N_2O$ 。然而，仅仅根据质量准确度即可排除这一初步匹配结果，因为该分子离子的误差达到了 48.62 ppm。这突出体现了 Q-TOF 获得的精确质量数据相对于单位质量仪器获得数据的优势。

使用精确质量数信息给出了该未知化合物的分子式 $C_{15}H_8O_2$ ，其质量数误差为 2.83 ppm。然而，采用该分子式在 NIST 质谱库中未能找到任何化合物。7200 GC/Q-TOF 的另一优势在于能够执行精确质量 MS/MS 分析，该分析对于未知物的结构解析非常有价值。

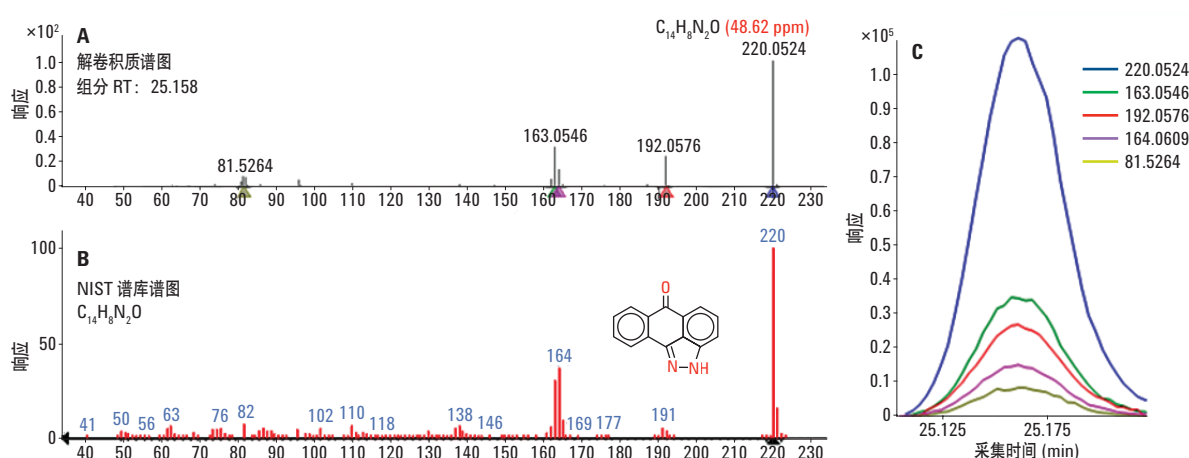


图 5. 未知化合物与初步 NIST 谱库匹配化合物之间的质谱图比较 (A,B)。解卷积离子的共流出曲线 (C) 确认它们全部属于同一组分。然而，仅仅根据质量准确度即可排除该化合物，因为其分子离子的误差达到了 48.62 ppm

图 6 显示了使用 MS/MS 模式通过精确质量碎片得出该未知化合物结构的工作流程。利用分子式生成器工具可为分子和主要碎片离子分配准确的经验式。为了给出该未知化合物的结构，将谱图作为 CEF 文件导入分子结构关联 (MSC) 软件，MSC 将搜索

ChemSpider 数据库以查找所有的结构异构体。虽然这种确证并不是完全明晰的，但它还是提供了对初步鉴定的 O-PAH 的进一步验证。图 7 示出了根据 MSC 软件中所列的碎片给出的碎裂途径。

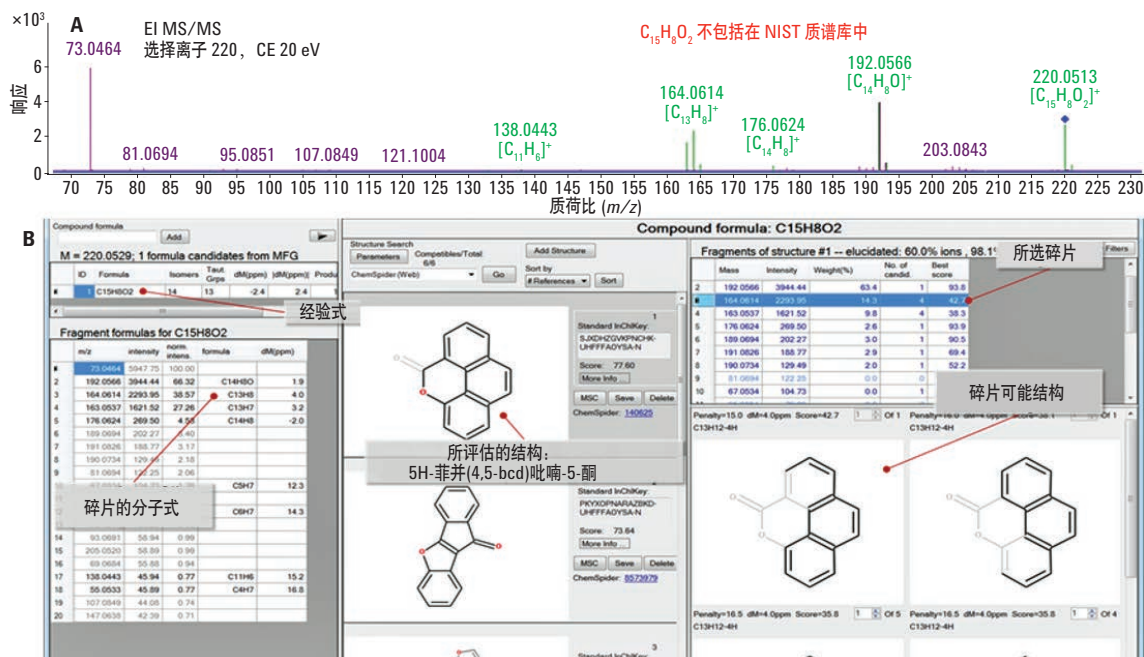


图 6. 使用分子式生成工具由 MS/MS 谱图生成的经验式 (A), 以及使用 MSC 软件对经验式为 $C_{15}H_8O_2$ 的化合物的结构解析结果 (B)。根据相对于所提出的分子式的质量误差, 以及需要断裂多少化学键来生成所给出的分子式的得分对每个单独的碎片离子进行了排序

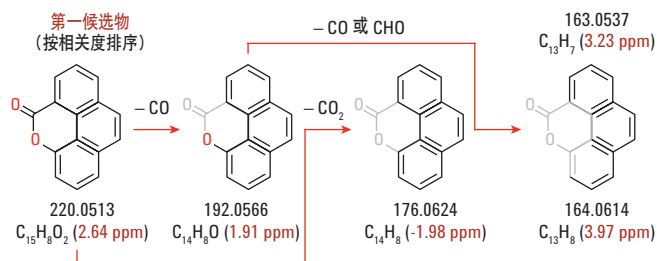


图 7. 根据 MSC 软件中所列碎片得到的 $C_{15}H_8O_2$ 候选物的碎裂途径

结论

利用 Agilent 7200 GC/Q-TOF 的多种功能（如精确质量数信息、全谱模式下的高灵敏度和 MS/MS 功能）可大大改善对气溶胶颗粒上吸附的 SVOC 化合物的研究。使用 Agilent MassHunter 软件的解卷积、自动碎片分子式标注和结构解析等功能得到了用于 SVOC 筛选的非靶向方法。通过谱库搜索进行的化合物确证和针对未知化合物的结构建议也是重要的研究工具。

参考文献

1. U. Pöschl. "Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects" *Angew Chem. Int.*, Ed. **44**, 7520-7540 (2005)
2. L.B. Liu, *et al.* "Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review" *J. Environ. Sci. (China)*, **19**, 1-11 (2007)

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详细信息，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，2016
2016 年 2 月 9 日，中国出版
5991-5899CHCN



Agilent Technologies

环境暴露与生物基质

环境暴露和生物基质中未知物的非靶向筛查

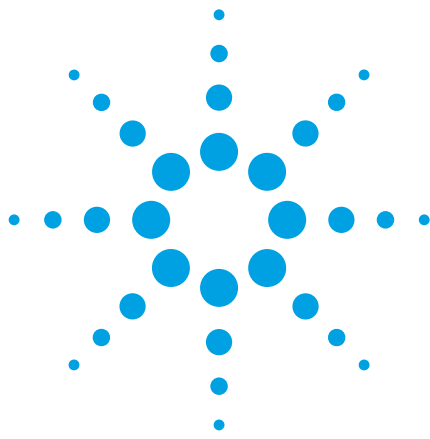
浓度与化学毒性决定了急性和慢性暴露于环境基质中的化学污染物所产生的生理反应。以效应为导向的分析有助于研究人员鉴定暴露于受污染的环境基质对发育中的生物群的影响。测定原污染物及其在水和土壤中的降解产物与转化产物并鉴定原污染物及代谢物的体内浓度有助于研究人员鉴定多数相关化学污染物。

对生物与化学相关性最高的污染物进行以效应为导向的成功表征需要采用先进的质谱技术进行可疑和非靶向筛查。安捷伦科技公司为生物基质中新兴污染物的研究提供了成熟可靠的全程解决方案。在不影响数据质量和谱图分辨率的情况下，我们用于可疑和非靶向筛查的样品前处理工具与系统可通过减少假阳性结果快速提供结果。请联系安捷伦，我们可以帮助您可靠地鉴定目标基质中的多数污染物。

► [返回目录](#)

► [返回前言](#)

www.agilent.com/chem/environmental



利用血液暴露组学研究来发现疾病起因

技术概述

作者

Stephen M. Rappaport 博士
暴露生物学中心
加州大学伯克利分校

Anthony Macherone 博士
安捷伦科技有限公司
访问学者, 约翰霍普金斯大学医学院

前言

2010 年全世界有 5280 万死亡病例, 其中约有三分之二是由慢性疾病引发, 主要包括心血管疾病 (> 1500 万) 和癌症 (> 700 万) [1]。因此, 我们应该查明慢性疾病主要是由遗传因素、环境暴露所致, 还是基于两者的某种联合作用。由瑞典家庭癌症数据库汇编的数据显示, 15 种常见癌症的遗传 (G) 风险为 10% 或更低 [2]。这就表明大约 90% 的致癌风险来自环境暴露 (E) 或 G×E 相互作用。当然, 除了悬浮颗粒物、吸烟和一些营养物质以外, 主要的致癌环境暴露因素尚不明确。

尽管癌症和其他慢性疾病的遗传风险都相对较小, 我们还是可以使用精妙的手段在人类疾病研究中探讨 G 因素的影响。事实上, 全基因组关联分析研究 (GWAS) 当前已测试出 2000-20000 个受试者 100 多万个单核苷酸多态性。相比之下, 个体环境暴露的影响推测还与一个世纪之前的做法相同, 来自于个人专访或自填问卷调查 [3]。G 和 E 特性的表征差异使我们无法对 G×E 的综合作用进行彻底研究, 因此, 必须开发一种用于环境暴露研究的数据导向分析的技术和方法 [4]。



Agilent Technologies

环境暴露指个体在一生当中所有化学暴露的总和，包括外源性（食物、污染物、电离辐射、药物、生活方式和感染等）和内源性（人和微生物群的新陈代谢、氧化应激、脂质过氧化、传染病和已存在的疾病等）两种来源。“如此来看，暴露组包括一切‘非基因组’，即囊括所有的传统组学方法” [5]。图 1 说明了暴露组在人类健康和疾病状态连续图中的定位。

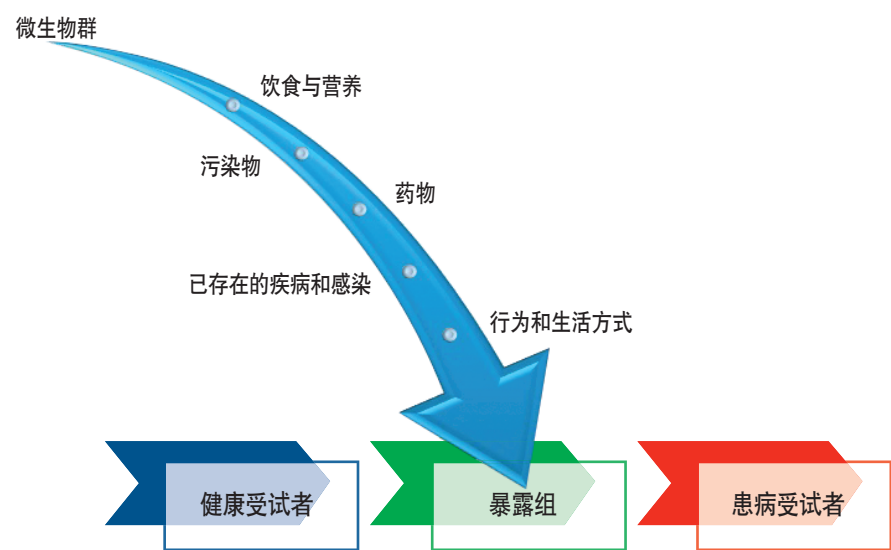


图 1. 暴露对人类慢性疾病的影响

用于发现和定位暴露源的两阶段策略

通过重点关注人体中循环的所有化学物质，血液暴露组促进了慢性疾病非遗传病因的研究，与通过 GWAS 研究遗传原因的方式相同 [6,7,4]。为此，加州大学伯克利分校暴露生物学中心主任 Stephen M. Rappaport 介绍了利用血液暴露组来研究病患及其对照组中重要暴露的两阶段方法，然后从大量人群的后续研究中确定这些暴露 [7]。

Rappaport 教授发现暴露组涉及人体血液中大概 20 万种循环化学物质，包括金属、小分子化合物、蛋白质和外源性 DNA。通过比较患病和健康受试者非目标血液暴露组的分析结果，他建议通过暴露组关联分析研究 (EWAS) 来查明具有特征性的化学物质 [7]。在独立的病例和对照样本中鉴定出这些关键化学物质，并在验证了它们与疾病的相关性之后，便可在大量人群血液的目标性分析中将这此化学物质用作暴露或疾病恶化的生物标记物。因此，用于发现和减少有害暴露的一个成功策略就是要进行原始数据导向的分析研究 (EWAS)，发现有前景的生物标记物，随后通过知识导向研究，利用这些生物标记物来阐明暴露-响应的关系（生化流行病学）、暴露和人体动力学的来源（暴露生物学），以及作用机制（系统生物学）。Rappaport 教授强调该两阶段策略将有利于减少有害暴露、改善公共健康、疾病早期诊断，以及个体化医疗干预措施。图 2 说明了 EWAS 的两阶段策略，随后是目标性研究。



图 2. 两阶段 EWAS 目标性分析策略可鉴定和减少有害暴露

测定暴露组

我们必须迎接巨大的技术挑战来实现 EWAS 和后续研究要求的极端复杂多成分、高灵敏度和高通量分析的必要结合。取数百名受试者每人 10–50 μL 血液、血清或血浆来进行非目标性 EWAS 研究，再从数千受试者中取相同体积的血液或血清进行生物标记物的目标性分析。许多 EWAS 的相关分析平台使用了高分离度液相色谱 (LC) 或气相色谱 (GC)，联用具有优异检测灵敏度和质量准确度的飞行时间 (TOF) 质谱 (MS)。随后使用机器人和带有多反应监测的三重四极杆质谱对有前景的生物标记物进行研究。通过从前瞻性群组研究中严格选取生物样本，能够使疾病恶化生物标记物与暴露相关的生物标记物区分开来。

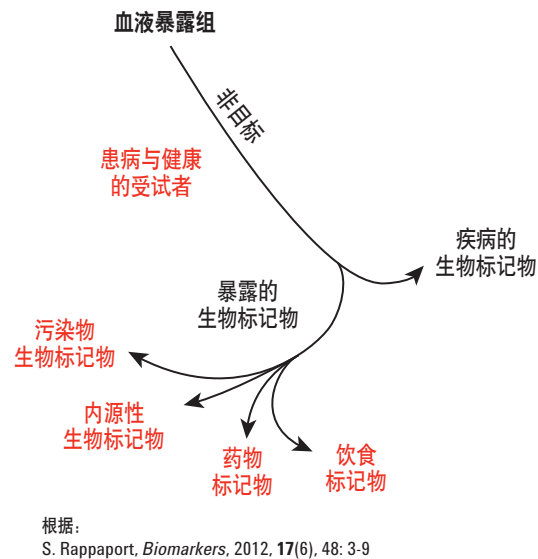


图 3. 血液 EWAS 可以区分暴露生物标记物（因果途径）和疾病生物标记物（反应途径）

概念验证研究已经鉴定出结肠直肠癌和心血管疾病暴露的未知生物标记物，以及糖尿病恶化的生物标记物 [7]。

分析策略

很明显，纳流型液相色谱/飞行时间质谱仪和液相色谱/三重四极杆质谱，以及气相色谱/飞行时间质谱仪、气相色谱/三重四极杆质谱等专用平台，对于保证数据导向的 EWAS 和目标性、高通量的后续研究的高灵敏度和精度是必不可少的。为此，Ivanisevic 和 Zhu 等人 (2013) [8] 报告了非目标性分析中从单一 100 μ L 血清或血浆样品中测定超过 30000 个独特特征的能力，方法采用反相液相色谱和亲水作用色谱 (HILIC)，质谱采用正离子和负离子电喷雾模式。分析方法采用 Agilent 1200 系列液相色谱系统和 Agilent 6538 UHD 精确质量四极杆-飞行时间液质联用系统，该方法也可用于小分子的 EWAS 研究。

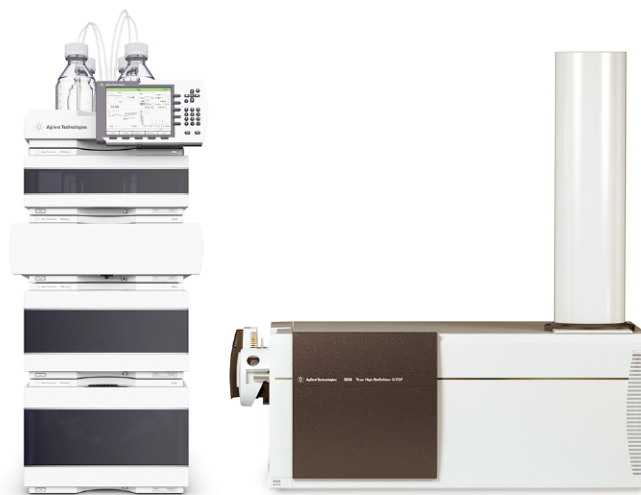


图 4. Agilent 1200 系列液相色谱系统和 Agilent 6500 系列精确质量四极杆飞行时间 (Q-TOF) 液质联用系统

另一个相关的分析方法涉及改进 Agilent-Fiehn 气质联用方法 [9]，包括 Agilent 7890B 气相色谱和 Agilent 7200 四极杆-飞行时间系统，用于研究甲氧胺盐酸盐和 MSTFA 衍生的血清提取物。在后采集加工过程中，可使用已收录了超过 1000 个化学条目的安捷伦保留时间锁定谱库对未知特征进行标注。这些数据可以独立使用，或者正交印证液质联用仪数据。



图 5. Agilent 7890A 气相色谱联用 Agilent 7200 四极杆-飞行时间系统

一旦对生物相关的生物标记物进行了标注和验证，我们就需要采用目标性高通量分析来测定相关暴露的生物标记物和疾病恶化的生物标记物。这种目标分析的一个相关实例涉及内分泌干扰物的测定，方法采用 Agilent 7890B 气相色谱和 Agilent 7000C 系列三重四极杆质谱系统 [10]。安捷伦气质联用系统类似的应用已在临床实验室开展，可在极低浓度水平下，测定乳腺癌研究中的雌激素生物标记物（例如， 17β -雌二醇可在 0.12 pg/mL ($4.4 \times 10^{-7} \text{ }\mu\text{M}$) 的浓度下被检测）[11]。

数据一旦收集完毕，我们就需要采用复杂的生物信息学软件来比较整个人群的生物标记物水平，并研究其协变量。Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件拥有先进的统计分析和可视化工具，用于气质联用仪、液质联用仪、毛细管电泳仪/质谱、电感耦合等离子体质谱仪的数据分析，可用来鉴定关键特征并进行全球分析。分析人员可进一步采用 Pathway Architect 工具将这些特征定位到相关生物学途径。

活性亲电试剂

活性亲电试剂代表了一类重要的毒性化学物质，它们产生于异型生物物质和内源性前体分子的新陈代谢、氧化应激和脂质过氧化 [12]。虽然这些亲电试剂的活性过强，不能在血液中直接被检测，但是可以通过测定它们与血液中大量蛋白质如人血清白蛋白 (HSA) 反应得到的加合物来推测其浓度。Rappaport 教授的实验室已经推荐了非目标性质谱方法，作为 EWAS [13] 的一部分，用于在亲核位点 Cys34 分析 HAS 加合物，还可用于采用高分辨质谱鉴定突出特征 [14]。

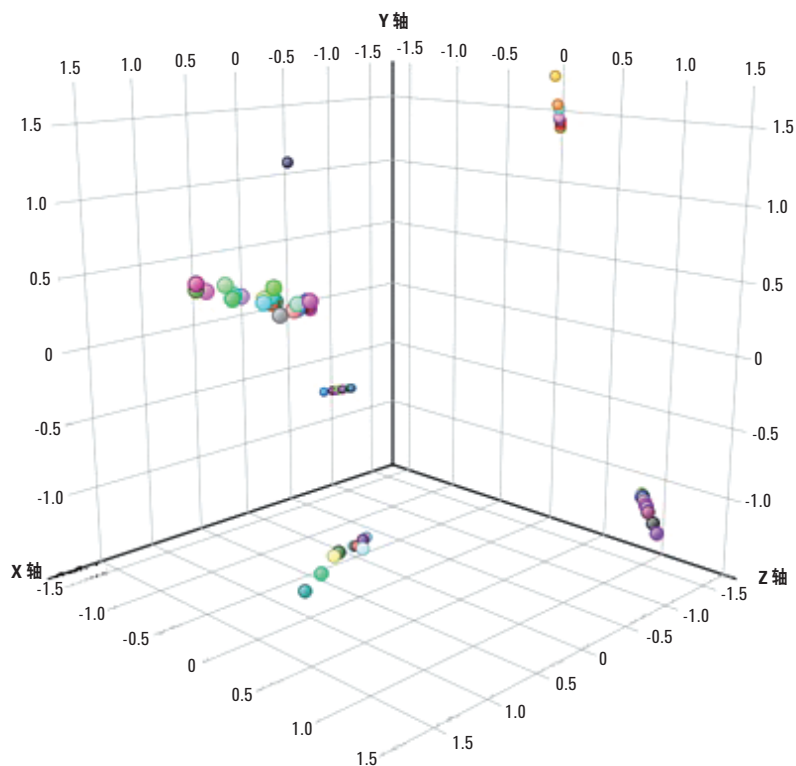


图 6. 采用 ANOVA 结果的 PCA 分析, Mass Profiler Professional 根据气相色谱/飞行时间质谱数据说明了不同化学型的分离

结论

暴露组学是一个在开放环境下的协作范例, 它将流行病学、环境毒理学、分析化学、营养学和微生物学结合在一起。由于暴露组学应用多种分析技术(色谱、光谱测定法、光谱和传感器阵列技术)和生物信息学来表征个体的暴露组, 它需要开发创新技术来满足高分辨率、高灵敏度和高通量 EWAS 和后续研究的要求。暴露组研究的现状与上世纪九十年代的基因组学研究类似。通过遵循一定目标整合某些组学技术(金属组学、代谢组学、蛋白组学和宏基因组学), 暴露组学这一新兴领域的研究能很好地揭示疾病发生的缺失环节, 并开展个体化医疗。

参考文献

1. R. Lozano, *et al.* (2012) "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010" *The Lancet* **380**(9859):2095-2128
2. K. Czene, P. Lichtenstein, K. Hemminki (2002) "Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database" *Int. J. Cancer* **99**(2):260-266
3. B.K. Armstrong, *et al.* (1992) "Principles of Exposure Measurement in Epidemiology" *Oxford Med. Pubs*
4. National Institutes of Health (2012) "The individual exposome project" Retrieved October 7, 2013 from: http://www.dpcpsi.nih.gov/council/pdf/Exposome_Project_concept%5B2%5D.pdf
5. J. Pleil (2012) "Categorizing biomarkers of the human exposome and developing metrics for assessing environmental sustainability" *J. Toxicology and Environmental Health, Part B* **15**:264-280
6. S.M. Rappaport, and M. T. Smith (2010) "Environment and disease risks" *Science* **330**(6003): 460-461
7. S.M. Rappaport, (2012) "Biomarkers intersect with the exposome" *Biomarkers* **17**(6): 483-489
8. J. Ivanisevic, *et al.* (2013) "Toward 'Omic Scale Metabolite Profiling: A Dual Separation-Mass Spectrometry Approach for Coverage of Lipid and Central Carbon Metabolism" *Anal. Chem.* **85**:6876-6884
9. M. Palazoglu, O. Fiehn (2009) "Metabolite Identification in Blood Plasma Using GC/MS and the Agilent Fiehn GC/MS Metabolomics RTL Library" (采用气质联用和 Agilent Fiehn 气质联用代谢组学 RTL 库进行血浆代谢物鉴定), 安捷伦科技有限公司应用简报 5990-3638EN. 安捷伦科技有限公司, 圣克拉拉, 加利福尼亚州
10. A. Macherone, M. Churley, (2013) "Monitoring steroidal analogues in clinical and environmental chemistry: one model for exposomics" The 61st Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 9-13. Minneapolis Convention Center, Minneapolis, Minnesota
11. C. Williard (2013) "Application of GC/MS/MS in Monitoring Steroids as a Pharmacokinetic and Pharmacological Biomarker" Retrieved April 1, 2013 from, <http://xtalks.com/xto525pharmanet-i3thankyou.ashx>
12. S.M. Rappaport, *et al.* (2012) "Adductomics: Characterizing exposures to reactive electrophiles" *Toxicology Letters* **213**(1): 83-90
13. H. Li, *et al.* (2011) "Profiling Cys34 adducts of human serum albumin by fixed-step selected reaction monitoring" *Mol. Cell Proteomics* **10**(3):M110 004606
14. H. Grigoryan, *et al.* (2012) "Cys34 adducts of reactive oxygen species in human serum albumin" *Chem. Res. Toxicol.* **25**(8):1633-42
15. S.M. Rappaport, (2011) "Implications of the exposome for exposure science" *J. Exposure Science and Environmental Epidemiology* **21**: 5-9

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本材料可能存在的错误, 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、说明及指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2013
2013年11月11日, 中国印刷
5991-3418CHCN



Agilent Technologies

ASMS 2015

TP 309

GC-MS/MS Analysis of Persistent Organic Pollutants (POPs) in Small Volumes of Human Plasma

Anthony Macherone^{1,2}, Sarah Daniels³, Alex L. Maggitti⁴, Melissa Churley¹, Matthew McMullin⁴, Martyn T. Smith³;
¹Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, ²Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD; ³University of California, Berkeley, CA;
⁴NMS Labs, Willow Grove, PA



Introduction

The risk of succumbing to chronic disease is linked to one's genome (G) and personal exposures. Studies suggest the genetic heritability of respiratory disease, cardiovascular disease and some cancers is very low: estimated to be 10% - 20%. The implication is that 80% - 90% of chronic human diseases are caused by exposures or some combination of exposures and the genome.

'It may be surprising to learn that the genetic heritability of respiratory disease, cardiovascular disease and many cancers is very low: estimated to be about 20%.'

The exposome (E) represents internal and external exposures throughout individuals' lifetimes. It includes the food we eat, the drugs we take, the chemical pollutants (POPs) we are exposed to and our internal chemistry. Even our jobs and lifestyle choices affect our exposome.

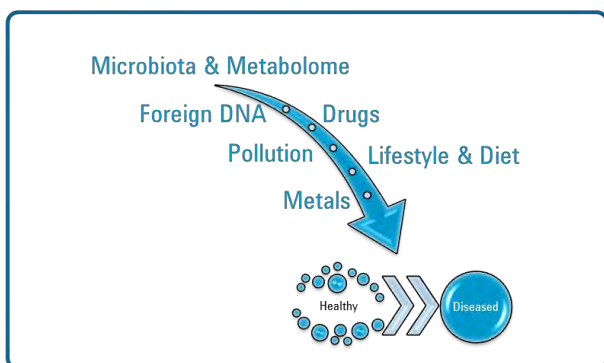


Figure 1. Exposure contributions to chronic human disease.

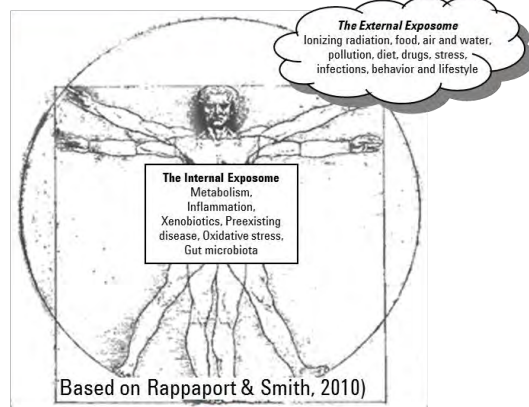
In his seminal paper, Wild (2005) defined the exposome as "life-course environmental exposures (including lifestyle factors), from the prenatal period onwards." He further discussed the asymmetry of tools enabling genomics research and those found in environmental studies. He posited that the disparity may be addressed by applying omics technologies to the measurement of exposures.

'The exposome is the "life-course environmental exposures (including lifestyle factors), from the prenatal period onwards."

The exposome can be considered as the complement to the genome (Pleil & Steigel, 2013). By means of discovery-based omics to characterize and correlate exposures and disease risk, exposome-wide association studies (EWAS) akin to genome-wide association studies (GWAS) can be conducted (Rappaport & Macherone, 2013).

'The exposome can be viewed as the complement to the genome.'

Measuring the Blood Exposome



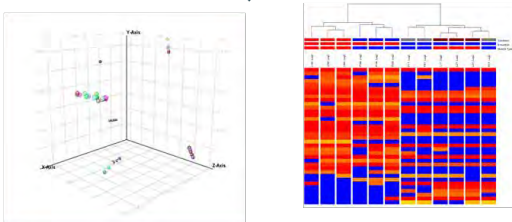
Sample collection



Extraction and Data Acquisition



Bioinformatics



Analytical Strategies

and D

'The exposome paradigm motivates studies of non-genetic causes of chronic diseases in much the same manner that GWAS explores genetic causes.'

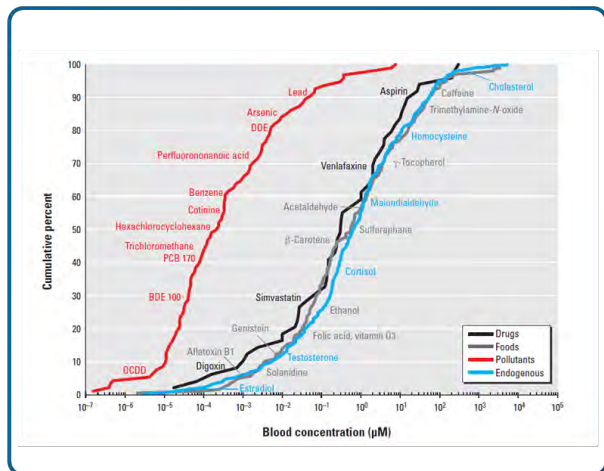


Figure 2. Blood concentrations of common exposure compounds. Reproduced from *Environmental Health Perspectives* (Rappaport, et al., 2014).

'POPs concentrations are 1000-fold lower than other chemicals in blood - therefore targeted GC-MS/MS is needed to study POPs in the exposome space.'

The concentration of persistent organic pollutants (POPs) in human blood is 1000-fold less than that of dietary chemicals, drugs and metabolites. Most non-targeted discovery-based analyses using liquid chromatography time-of-flight or Fourier transform mass spectrometry fail to detect approximately 70% of these compounds. Targeted GC-MS/MS demonstrates greater coverage of the POPs concentration range in blood with detection limits as low as 5 pg/mL.

'Most non-targeted analyses fail to detect approximately 70% of POPs in Blood.'

A successful strategy for discovering and reducing harmful exposures requires initial data-driven investigations (EWAS), to find promising biomarkers, followed by knowledge-driven studies to:

- Elucidate exposure-response relationships (biochemical epidemiology)
- Determine sources of exposure and human kinetics (exposure biology)
- Define mechanisms of action (systems biology)

Methods

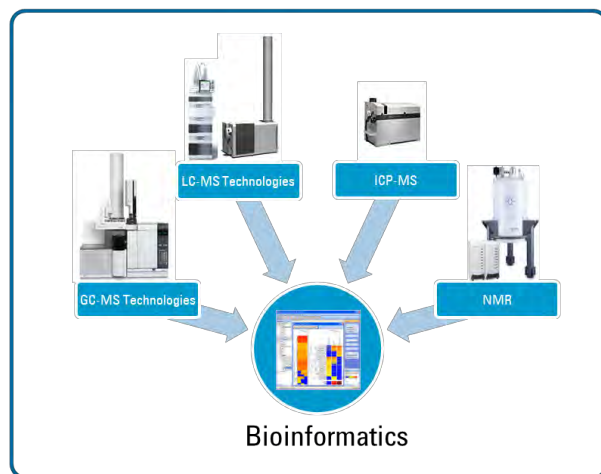


Figure 3. To measure the exposome, one leverages "omics" tools such as chromatography, spectrometry, spectroscopy, and bioinformatics.'

Fifty-one human plasma samples and three reference samples (200 µL each) were extracted. The procedure was:

- Aliquot 200 µL plasma
- Add 1mL 10M Urea
- Add 1mL 10% Propanol/Water, 1mL MeOH, 6mL petroleum ether
- Centrifuge, transfer the organic layer
- Filter through ~1g Florisil
- Elute with MTBE / pet ether
- Evaporate to dryness
- Reconstitute prior to injection

$^{13}\text{C}_{12}$ -DDT internal standard was used to account for signal attenuation. An Agilent 7890B GC and 7010 GC-triple quadrupole mass spectrometer operated in EI MRM Mode was used. The column was a HP-5MSUI (30 m x 250 µm x 0.25 µm). The transfer line was set at 300 °C. The source temperature was 350 °C. The collision gas was nitrogen at 1.5 mL/min. Targeted MRM was performed for 67 POPs representing 6 POPs chemical classes. For each compound, one quantifying MRM and one qualifying MRM was defined. System performance and precision was monitored at three concentration levels. Each sample was injected at 1 µL in triplicate.

'Targeted GC-MS/MS demonstrates greater coverage of the POPs concentration range compared to discovery-based electrospray methods.'

Results & Discussion

The analytical method needed to be sensitive enough to detect the analytes at levels as low as 5.0 pg/mL from the small extraction volume. To that end, 16 polyaromatic hydrocarbons, 12 dioxin-like polychlorinated biphenyls, 12 polybrominated diphenylethers, 17 organochlorine pesticides, 5 dioxins and 5 furans were measured in human plasma via targeted GC-MS/MS.

Replicate area precision for the 13C12-DDT internal standard averaged $\leq 3\%$ RSD (min = 0.38% RSD; max = 6.79% RSD; n = 153). Retention time precision was ± 0.122 minutes (n = 9,608).

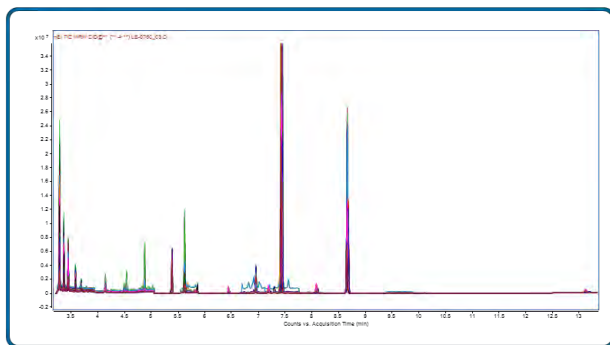


Figure 4. Overlay of 153 sample injections (51 samples x 3 technical replicates each).

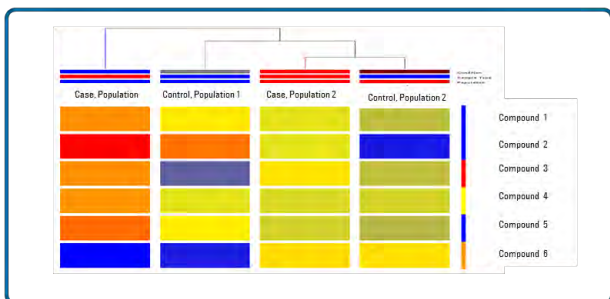


Figure 5. Hierarchical Cluster: QC – Filter by present or marginal, One-way ANOVA p cutoff = 0.05; Fold change ≥ 2

Summary of univariate & covariate analysis

Single variable (case / control)

- One compound was significantly correlated with case

Two variable (case / control, population)

- Four compounds moderately correlated with one population / case vs. other conditions
 - One identified in single variable analysis as above
- One compound highly correlated with one population / case vs. other conditions
 - Not identified in single variable analysis

One compound inversely correlated with one population / case vs. other conditions

Conclusions

Bio-specimens from prospective cohorts are precious. Typically an investigator may be granted as little as 200 μ L sample from each participant. Most analytical procedures to measure POPs in bio-fluids require much more sample for extraction. For example, the Lab 28 methods associated with the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) used to measure POPs in serum require as much as 10 mL sample volume. Therefore, rigorous extractions and highly sensitive / specific mass spectrometry methods are crucial to ensure the analytes can be detected from sample volumes of 200 μ L and efforts are being made to reduce the sample volume to 100 μ L or less.

The results demonstrated greater coverage of the POPs concentration range with detection limits as low as 5 pg/mL from the 200 μ L plasma samples. These values were determined based on the wet sample volume without consideration of lipid profiles. Nonetheless, the ability to measure POPs in human bio-fluids at very low concentration levels from small extraction volumes will vastly improve exposure assessment within the exposome paradigm.

‘The exposome is a quantity of critical interest if we are to fully define the causative factors in chronic human disease.’

Bibliography

- Pleil, J.D., Stiegel, M.A. *Anal. Chem.* (2013) 85:9984–9990.
 Rappaport, S. M. *Biomarkers.* (2012) 17;6:483-489.
 Rappaport, S.M. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* (2011) 21:5-9.
 Rappaport, S.M., Barupal, D.K., Wishart, D., Vineis, P., Scalbert, A. *Environ Health Perspect.* (2014) 122;8:769-774.
 Rappaport, S.M., Macherone A. (2013) Agilent Technical Brief 5991-3418EN, Agilent Technologies, Inc.
 Rappaport, S.M., Smith, M.T. (2010) *Science.* 330;6003:460-461.
 Wild, C.P. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* (2005) 14;8:1847-1850.

AM is a Visiting Scientist in the Department of Biological Chemistry at Johns Hopkins School of Medicine

如需了解提高环境分析工作效率的更多信息,
请访问

www.agilent.com/chem/environmental

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

仅限研究使用。本文中的信息、说明和技术指标如有变更,
恕不另行通知。安捷伦科技公司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。

安捷伦科技(中国)有限公司, 2015

2015年12月10日, 中国出版

5991-6489CHCN



Agilent Technologies