

# 利用 LC/Q-TOF 鉴定地下水和地表水中的未知物

## 作者

E. Michael Thurman、  
Imma Ferrer  
科罗拉多大学环境质谱分析中心，  
美国科罗拉多州波尔得

Jerry A. Zweigenbaum  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本研究使用 LC/Q-TOF 与一系列精确质量数工具进行精确质量数分析，以鉴定美国科罗拉多州丹佛市附近的南普拉特河沿岸的地表水和地下水中的目标药物、可疑药物、未知药物及它们的降解产物。利用仪器具有的对未知药物的检测能力考察药物从大都市区域（丹佛）到南普拉特河以及最终到附近冲积层地下水的迁移和去除过程。本研究是采用未知物鉴定来了解药物在地下水和地表水系统中的迁移和去除的一个很好的示例。

## 前言

自 20 世纪 90 年代末以来，作为地表水中药物来源的废水的重要性得到广泛研究，1998 年发表了一篇有关此问题的著名综述<sup>1</sup>。在该综述发表后，美国地质调查局对地表水中的药物展开了研究<sup>2</sup>。两项研究均发现城市污水是水样中药物的主要来源。从那时起，已发表了数千篇关于地表水和废水中出现药物的论文，其中包括许多综述文章<sup>3,4</sup>。然而，尽管最早有关水中药物的文献报道是地下水受污水影响<sup>3</sup>，但与地下水中发现药物相关的研究或综述却非常少<sup>4</sup>。

本研究介绍了分析工作流程和一套采用精确质量数的分析工具，它们已成功用于通过液相色谱与四极杆飞行时间质谱仪联用系统 (LC/Q-TOF-MS) 鉴定药物及其降解物。此外，使用这些工作流程，在科罗拉多州丹佛市附近的南普拉特河中发现了可疑药物和未知药物。最后，使用 LC/Q-TOF-MS 测量受南普拉特河影响的冲积层地下水井中的这些药物及其降解物，以更好地了解药物的迁移和去除。本应用简报是许多使用 Agilent 6500 系列 LC/Q-TOF-MS 进行地表水和地下水中药物检测的研究汇编。

## 实验部分

### 样品

2016 年，在三个月内从沿南普拉特河的 10 个冲积层井中多次采样。使用标准地下水地表水采样方法，这些方法均使用蠕动泵和气囊泵<sup>5</sup>。此外，还在 2009–2010 年从南普拉特河和两个冲积层井中采样，一年内每月采样一次。所有冲积层井都与南普拉特河存在水文联系。对南普拉特河本身进行随机采样。图 1 展示了沿河冲积层井的位置。

### 分析方法

使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统对分析物进行分离，该系统配备 150 mm × 4.6 mm、填料粒径为 3.5 μm 的反相 C8 分析柱 (Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8)。柱温保持在 25 °C。进样量为 10 μL。流动相 A 和 B 分别为 0.1% 甲酸水溶液和乙腈。经优化的色谱方法在初始流动相组成 (10% A) 下保持恒定 5 分钟，然后通过线性梯度在 30 分钟后增加至 100% A。

HPLC 系统与配备安捷伦喷射流离子源的 Agilent 6545 LC/Q-TOF 联用。使用 Agilent MassHunter 软件对记录的数据进行处理。

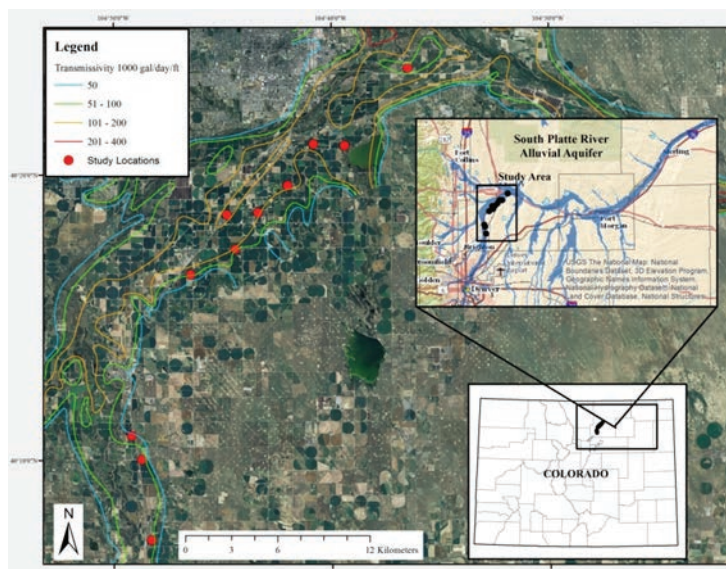


图 1. 沿科罗拉多州丹佛市以北约 30 英里处的南普拉特河的地下水井的位置<sup>5</sup>

## 样品前处理

使用离线固相萃取 (SPE) 技术浓缩样品，该技术支持通过 MS 分析、MS/MS 分析法多次分析样品，并可达到所需的 ng/L 浓度。在 Gilson 自动化系统上使用 SPE 处理 100 mL 水样。用 5 mL 甲醇洗脱样品，然后用氮气吹蒸至 0.5 mL，最终浓缩系数为 200 倍。该方法是一种通用方法，已成功用于分析地表水和废水中的抗抑郁药物<sup>6</sup>。

## 结果与讨论

### 分析工作流程和所用工具

对地下水和地表水样品的分析需要采用一种能同时检测可疑药物和未知药物的工作流程方法。表 1 展示了用于可疑物和未知物分析的全套工具，图 2 展示了使用迭代系统对未知样品进行全面分析的工作流程系统。四类工具包括：

- 硬件
- 软件
- 离子化学工具
- 与地表水和地下水化学相关的物理、化学和生物学工具

这种方法在鉴定地表水和地下水样品中的可疑药物和未知药物过程中非常有效。

表 1. 用于未知物和可疑物分析的工具

### 硬件工具

- 高分离度和精确质量数<sup>7-8, 25</sup>
- 全离子、自动 MS/MS、伪 MS<sup>3 (22-24)</sup>

### 软件工具

- 数据库、谱库<sup>14</sup>
- Kendrick 质量数、质量数结构关联工具、元素强制程序、同位素计算器<sup>14-16, 26</sup>

### 离子化学工具

- 加合物形成 (规则 5)、碎裂工具 (诊断和碎片离子)、碎裂规则 (N 规则和奇偶电子离子规则)<sup>8, 9, 16, 17</sup>

### 物理和生化工具 — 创造性思维

- 生化途径<sup>18, 19</sup>
- 生物降解途径<sup>6, 19</sup>
- 紫外降解和化学氧化<sup>20, 21</sup>
- 相关途径

### 所用工具

在图 2 的工作流程中，首先在 TOF 模式下采集的精确质量数文件中搜索可疑物列表。可疑物列表与目标物列表的不同之处在于，可疑物仅有精确质量数是已知的 (有时可能已知保留时间，但是当前无可用的标准品，这是可疑物或非目

标物列表的实际定义)。目标化合物将具有保留时间和若干确认离子，基于鉴定点的概念使用精确质量数进行确认<sup>7</sup>。所用的可疑物/非目标物列表是已在地表水和废水中发现的 100 种常见药物的列表<sup>8</sup>。

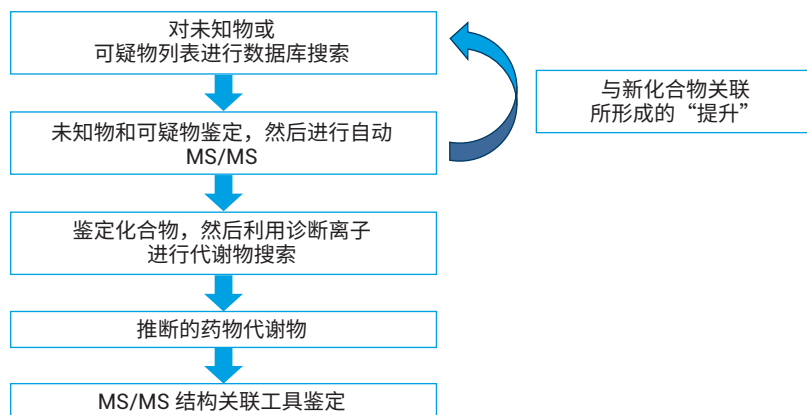


图 2. 用于未知物和可疑物鉴定的分析流程

可采用两种方法，即 Excel 数据库 (CSV 文件) 或称为个人化合物数据库 (PCD.cdb) 文件的安捷伦数据库搜索。个人化合物数据库和谱库 (PCDL.cdb) 文件的谱库部分还包含 MS/MS 谱图。PCD.cdb 文件还可包含结构的 mol 文件，该文件可轻松导入分子结构关联软件以进行片段验证。两种文件均易于创建和使用。

本研究中检测和确认的 22 种化合物包括：

- 用于控制血压的  $\beta$ -受体阻滞剂药物
- 抗生素
- 抗抑郁药物
- 咖啡因
- 三氯蔗糖，一种低热量甜味剂

$\beta$ -受体阻滞剂、抗生素和抗抑郁药物包括：

- 阿替洛尔
- 阿奇霉素
- 安非他酮
- 甲红霉素
- 可待因
- 右啡烷
- 地尔硫卓
- 苯海拉明
- 无水红霉素
- 加巴喷丁
- 拉莫三嗪
- 美托洛尔
- 羟考酮
- 磺胺甲恶唑
- 噻菌灵
- 甲氧苄啶
- 文拉法辛
- 这些药物的各种代谢物

除使用表 1 中的工具和图 2 中的工作流程以外，还使用其他工具（诸如诊断离子）检测代谢物（图 2 中的框 3）。诊断离子是指同一类药物通常具有相似的碎片离子或能够诊断这些药物结构的离子。Ferrer 和 Thurman 的论文<sup>8,9</sup> 列出了大约三种可用作诊断离子的碎片离子，它们可用于鉴定同一系列的相关药物和农药或检出的化合物的代谢物。

这种工具的一个很好的应用示例是发现了拉莫三嗪葡萄糖苷酸，通过使用多种工具（包括氯元素过滤器和诊断碎片离子）在南普拉特河中发现该化合物<sup>10</sup>。在本例中，诊断离子是  $m/z$  256 离子，该离子的质量数与母体化合物拉莫三嗪的质子化分子的质量数相同。最终在 MS/MS 和标准品匹配后鉴定出该化合物<sup>10</sup>。

图 2 中框 5 所示的分子结构关联软件是另一种有用的工具。在购得标准品之前，可以进行 MS/MS 分析。然后使用结构关联工具来研究精确质量数碎片离子，如果可能的话，该结构关联工具将会为每种碎片分配正确的精确质量数。这种工具非常适合用于可疑药物分析，因为很少有两种化合物具有相同的碎片离子，尽管这种情况偶尔也会发生<sup>11</sup>（例如在鉴定曲马多与文拉法辛的代谢物的情况下）。

最后，图 2 中的框 6 展示了迭代使用工作流程图的优势。化合物之间可能存在关联或“提升”(lift)。“提升”是一个营销术语，表示销量随特定的广告而增长。在这里，我们使用“提升”来表示由于一种化合物以混合物形式出售或与另一种化合物一起提供，由此可推断此化合物存在。由于这些化合物在水处理和迁移过程中具有不同的化学反应和去除过程，因此它们在水样中的浓度不相关。因此，一种化合物的存在可以“提升”另一种化合物存在的机率或表明可能存在另一种化合物。在这种情况下，两种化合物在用途上具有相关性，但是不一定以 1:1 相关。一个很好的例子是在南普拉特河中检出磺胺甲恶唑（表 2），该药物通常作为抗生素治疗尿路感染，并且与甲氧苄啶一起使用。当搜索甲氧苄啶的精确质量数时，发现它的强度低于数据库可疑药物搜索的截止限，但是该化合物以痕量水平存在。它优先通过废水处理除去，但是其浓度仍可能略高于分析方法的检测限，这显示了使用工作流程图在可疑药物分析和未知物鉴定中检测出各种化合物的优势。

## 冲积层地下水中的药物

在距离南普拉特河 100–500 m 的冲积层地下水中，经常检出 8 种化合物。这些化合物包括：

- 安非他酮
- 咖啡因
- 卡马西平
- 加巴喷丁，一种卡马西平的代谢物
- 拉莫三嗪
- 三氯蔗糖
- 磺胺甲恶唑

相比在南普拉特河中确认检出的 22 种化合物，在冲积层地下水中检出的化合物有所减少。当河水流入冲积层井时，通过堤岸过滤被去除或稀释至检测限以下的 14 种化合物包括：

- 阿替洛尔
- 阿奇霉素
- 甲红霉素
- 可待因
- 右啡烷
- 地尔硫卓
- 苯海拉明
- 无水红霉素
- 美托洛尔
- 羟考酮
- 噻菌灵
- 甲氧苄啶
- 文拉法辛及其代谢物

在 2009–2010 年对更靠近南普拉特河（大约 50 m）的地下水井采样中，还检测到阿替洛尔、苯海拉明、文拉法辛及其代谢物，表明这些化合物极少发生迁移。

表 2. 本研究使用的 LC 和 MS 以及 MS/MS 仪器条件

用于 1290 Infinity II 液相色谱系统的液相色谱条件	
色谱柱	ZORBAX Eclipse XDB-C8 150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm (部件号 963967-906)
柱温	25 °C
进样量	10 μL
流动相	A) 乙腈 B) 0.1% 甲酸水溶液
运行时间	30 分钟
流速	0.6 mL/min
梯度	时间为 0 处，90% B，保持 5.0 分钟， 在 30 分钟内逐渐增加至 100% B， 后运行时间：10 分钟
正离子模式下的 MS 条件	
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
气体温度	250 °C
脱溶剂气流速	10 L/min
雾化器压力	45 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	0 V
锥孔电压	65 V
八极杆射频电压	750 V
精确质量数谱图范围	50–1000 m/z
碎裂电压	190 V
自动 MS/MS 条件	
四极杆分离宽度	1.3 m/z
碰撞能量	15 eV, 30 eV
MS 质量数范围	100–1000 m/z
MS 采集速率	4 幅谱图/秒
MS/MS 质量数范围	40–700 m/z
MS/MS 采集速率	4 幅谱图/秒
阈值	25000 响应值
相对阈值	0.01%
主动排除	启用，在 1 s 后排除，在 0.2 min 后发布
静态排除	118–123 m/z 700–1000 m/z
模式	常见有机分子，仅单电荷母离子，按丰度对母离子排序，扫描速度因母离子丰度而异，目标物为 50000 响应值/质谱图
纯度	100%，纯度截止限为 30%

图 3 为保守迁移（即非去除）的一个很好的示例，其中包括药物和甜味剂。它们是加巴喷丁和三氯蔗糖。这两种南普拉特河中存在的化合物一种浓度未发生变化，一种在通过冲积层地下水时仅减少 50%，即使距离河流 500 m 远处也是如此。

三氯蔗糖浓度是南普拉特河中浓度的 50%，而加巴喷丁的浓度与河流中的浓度相同。然后将这两种化合物与通过 LC/Q-TOF-MS 分析发现的其他药物进行比较。例如，图 4 展示了阿替洛尔和苯海拉明相对于南普拉特河的去除率。血压调节药物阿替洛尔的去除率为 90%，而非处方抗组胺药物苯海拉明的去除率为 99%。两种化合物都被认为吸附在了冲积含水层的沉积物上。

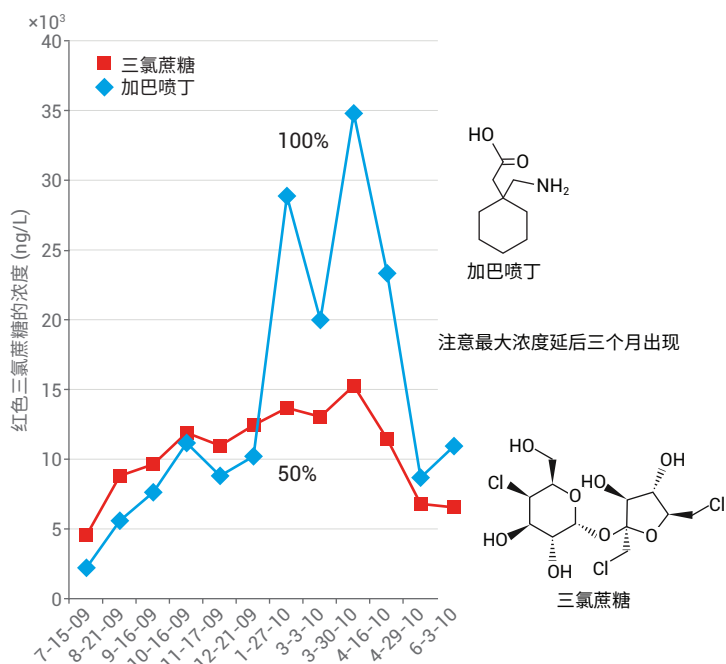


图 3. 加巴喷丁药物和三氯蔗糖甜味剂在冲积层地下水流中的保守迹线

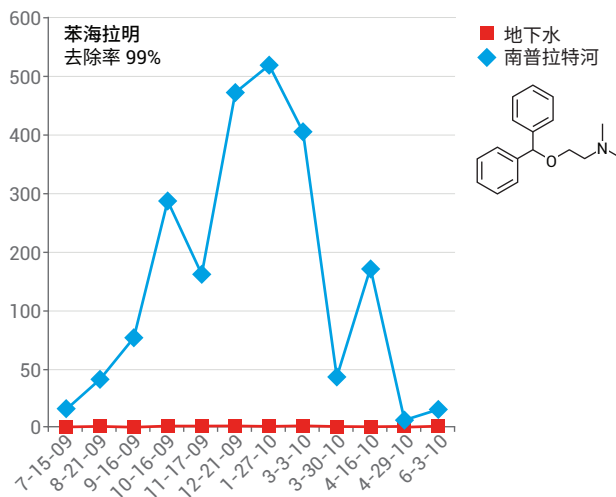
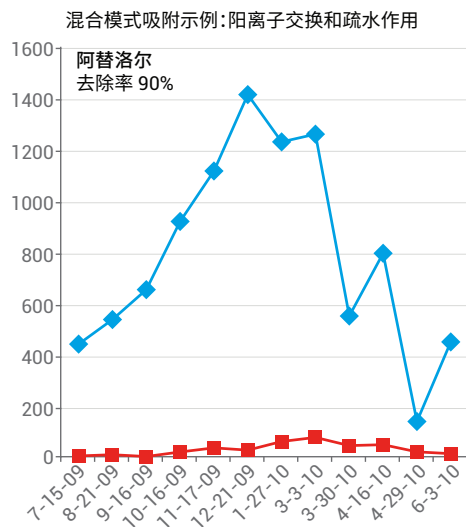


图 4. 冲积层地下水中阿替洛尔和苯海拉明相对于南普拉特河的去除率

尽管尚不清楚去除的原因，但是由疏水作用和阳离子交换引起的吸附可能是这些药物在通过地下水迁移时被去除的重要机制。图 5 展示了这种从冲积层地下水去除药物（文拉法辛及其代谢物去甲文拉法辛）的另一个示例。

在这个示例中，文拉法辛及其主要代谢物在迁移到靠近南普拉特河的冲积层井的过程中被去除了 60%。存在的氨基可以在地下水的 pH（约 7.5）条件下部分质子化。因此，阳离子交换和疏水作用有助于从地下水去除这种抗抑郁药物及其代

谢物。这两种化合物的重要性还在于，当使用氯胺进行水纯化时，它们是水处理过程中 N-亚甲基二硝胺 (NDMA) 的来源<sup>12</sup>。显然，二甲胺基团与氯胺反应形成 NDMA<sup>12</sup>。

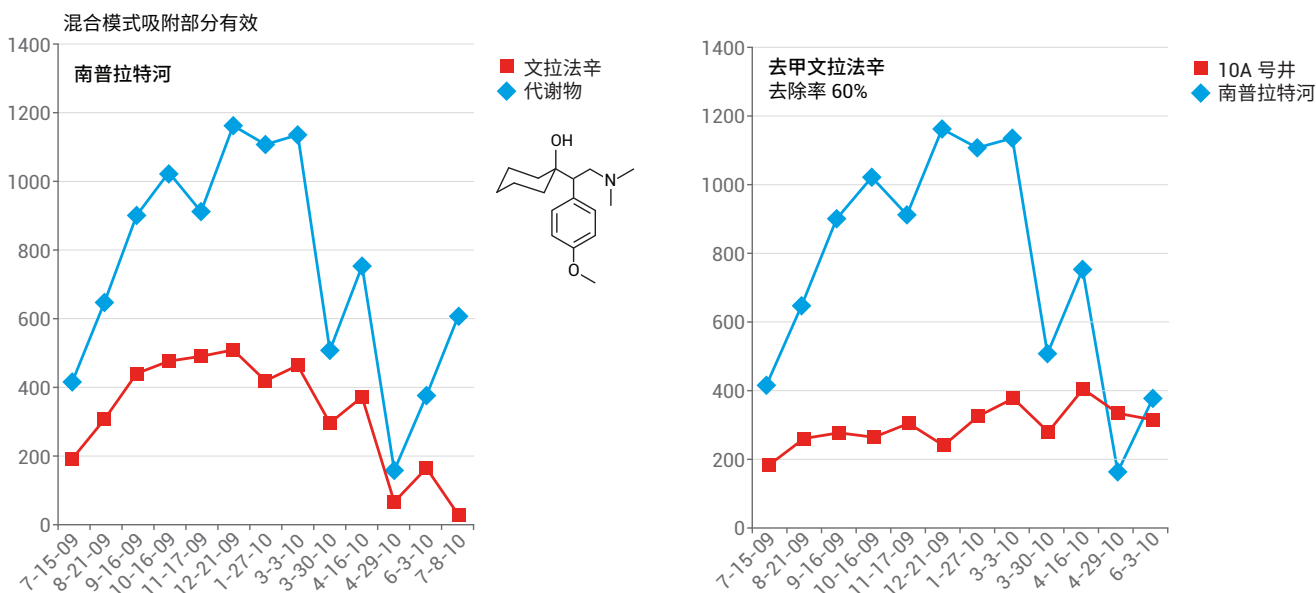


图 5. 距离南普拉特河 50 m 的冲积层地下水中的文拉法辛和去甲文拉法辛

图 6 展示了在距离南普拉特河 100–500 m 的冲积层地下水中几乎总能检出的三种药物。这些化合物是卡马西平、拉莫三嗪和磺胺甲恶唑。其中两种为抗抑郁药物，一种为抗生素。随着时间的推移，化合物的浓度可能会发生较大变化，其中拉莫三嗪始终具有最高的浓度，这种趋势在有关废水的文献中有所报道<sup>10</sup>。这三种化合物对于未来的地下水和药物研究非常重要。在本例中，同样重要的是要意识到浓度可能因河水水源的原因而迅速变化，因为这些河水受丹佛地区废水排放和许多药物的季节性使用的影响。

最后，冲积层地下水的一个重要用途是用作饮用水源，特别是在干旱的美国西部沿河地区。事实上，南普拉特河是一个很好的示例，因为它在汇入密苏里河之前从丹佛流至密苏里州堪萨斯城附近。沿着这条 600 英里长的河道，冲积层地下水是内布拉斯加州和科罗拉多州东部许多社区的饮用水源。因此，本文报告的结果对饮用水标准具有重要影响，并展示了可疑及未知化合物的分析对于水资源重复利用极为重要的西部干旱地区在确保水质中的重要性。在这个意义上，水资源重复利用意味着废水可能通过渗透到地下水来净化，然后作为饮用水源使用。

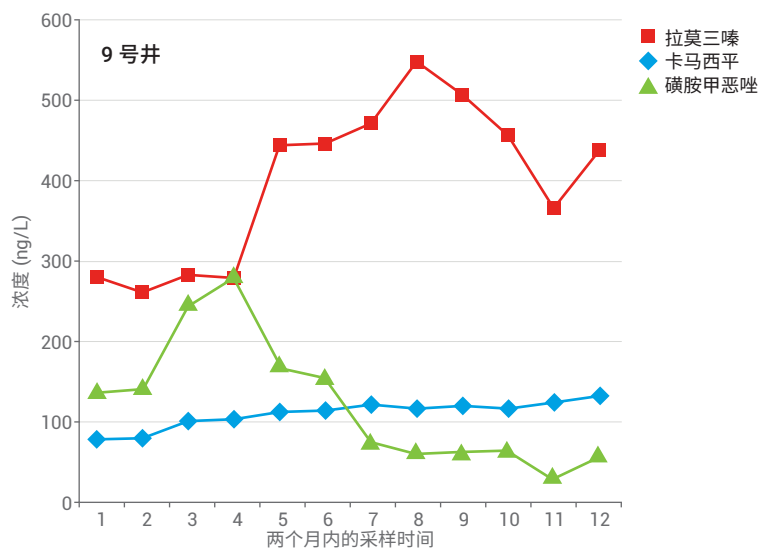


图 6. 在两个月内测得的地下水中的三种药物的浓度

## 结论

未知物的鉴定需要采用一套复杂的工具，本应用简报对此进行了介绍，并在表 1 中列出。工具主要包括四大类：硬件、软件、离子化学工具以及物理和生化工具。本应用简报中所包含的参考集（如图 2 所示）是如何应用这些不同工具的示例指南。硬件和软件工具仍在不断发展，分辨率和质量数准确度在不断提高。随着精确

质量数数据库的不断发展，自动 MS/MS 非常实用。离子化学工具以及物理和生化工具的应用是一个围绕用户测试目的发展的精确质量数研究领域。要解决的问题类型（例如阿片类药物）将决定离子化学和生化途径。这些工具通过软件得以增强，但是由用户的应用推动。最终，随着更多应用和问题通过 LC/Q-TOF 分析得以解决，对未知物的研究将继续向前发展。

## 参考文献

1. Halling-Sorenson, B., *et al.* 1998, Occurrence, fate, and effects of pharmaceuticals in the environment-A review: *Chemosphere*, **36**, 357–394
2. Kolpin, D.W. *et al.* Pharmaceuticals, hormones, and other wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance, *Environmental Science and Technology* **2002**, *36*, 1202–1211
3. Heberer, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letter* **2002**, *131*, 5–17
4. Lapworth, D. J. *et al.* Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate, and occurrence, *Environmental Pollution* **2012**, *163*, 287–303
5. Mauch, K., *et al.* Analytical comparison of HydraSleeve to low-flow sampling in NPS groundwater monitoring efforts, *Groundwater Monitoring Review: In review* **2018**
6. Writer, J. H.; Ferrer, I.; Thurman, E. M. Widespread occurrence of pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters, *Science of the Total Environment* **2013**, *461*, 519–527
7. Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Zweigenbaum, J. A. High resolution and accurate mass analysis of xenobiotics in food, *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 6702–6708
8. Ferrer, I.; Thurman, E. M. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatog. A* **2012**, *1259*, 148-157
9. Ferrer, I.; Thurman, E. M. Multiresidue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography time of flight mass spectrometry, *J. Chromatog. A* **2007**, *1175*, 24–37
10. Ferrer, I.; Thurman, E. M. Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite liquid chromatography time of flight mass spectrometry: *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 8161-8168
11. Ferrer, I.; Thurman, E. M. 采用高分辨质谱分析法 (LC/Q-TOF/MS) 检测水中的药物, 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-3261CHCN, **2013**
12. Hanigan, D.; *et al.* LC/Q-TOF-MS fragmentation of N-Nitrosodimethylamine precursors in drinking water supplies is predictable and aids in their identification, *J. Hazardous Materials* **2017**, *323*, 18–25
13. Ferrer, I.; Thurman, E. M.; Zweigenbaum, J. A. 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? 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5990-6430CHCN, **2010**
14. 安捷伦科技有限公司 MassHunter 法医毒理学 PCF 和 PCDL, G6855-90012, 安捷伦科技公司网站, **2015**
15. Agilent MassHunter 分子结构关联软件, G3335-90126, 安捷伦科技公司网站, **2011**
16. Thurman, E. M.; Ferrer, I.; *et al.* Analysis of hydraulic flowback and produced waters using accurate mass: Identification of ethoxylated surfactants, *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 9653–9661
17. Thurman, E. M.; Ferrer, I.; *et al.* The even-electron rule in the electrospray mass spectra of pesticides, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 3855-3868
18. Thurman, E. M.; *et al.* Identification of imidacloprid metabolites in onion (*Allium cepa* L.) using high resolution mass spectrometry and accurate mass tools, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 1891-1903
19. Thurman, E. M.; Ferrer, I. Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry with metabolic profiling of human urine as a tool for environmental analysis of dextromethorphan, *J. Chromatog. A* **2012**, *1259*, 158–166
20. Keen, O. S.; Ferrer, I.; Thurman, E. M. Degradation pathways of lamotrigine under advanced treatment by direct UV photolysis, hydroxyl radical, and ozone, *Chemosphere* **2014**, *117*, 316–323
21. Fernandez-Ramos, C.; Ferrer, I.; *et al.* Identification of prometone, deisopropylprometone, and hydroxyprometone in groundwater by high resolution liquid chromatography/mass spectrometry, *Science of the Total Environment* **2014**, *497*, 459–466
22. Padilla-Sanchez, J. A.; Thurman, E. M.; *et al.* Identification of pesticide transformation products in agricultural soils using liquid chromatography/ time of flight mass spectrometry: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 1091-1099

23. All Ions MS-MS: Targeted screening and quantitation using Agilent TOF and Q-TOF systems (全离子 MS-MS: 使用安捷伦 TOF 和 Q-TOF 进行靶向筛查和定量分析), 安捷伦科技公司, 共 10 页, 出版号 5991-2465EN, **2013**
24. Ferrer, I.; Thurman, E. M.; Zweigenbaum, J. A. Use of Auto MS/MS Methods using MassHunter for the identification of small molecules (使用自动 MS/MS 方法与 MassHunter 鉴定小分子), 安捷伦科技公司应用简报, 待发表 **2018**
25. Ferrer, I.; *et al.* Both high-resolution chromatography and accurate mass spectrometry are essential for the analysis of isobaric pesticides in complex food matrices (高分离度色谱和精确质谱对复杂食品基质中的同重农药分析同样重要), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5216EN, **2014**
26. Thurman, E. M.; Ferrer, I. Accurate mass analysis of hydraulic fracturing waters: Identification of polyethylene glycol surfactants by LC/Q-TOF-MS (水力压裂水的精确质量分析: 利用 LC/Q-TOF-MS 鉴定聚乙二醇表面活性剂), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-5473EN, **2015**

[www.agilent.com](http://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, 2018  
2018 年 5 月 29 日, 中国出版  
5991-9469ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

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

