

使用高分辨率 Agilent 7250 GC/Q-TOF 分析废水出水样品以鉴定有毒化学物质

作者

Sofia Nieto 和 Kai Chen
安捷伦科技有限公司

Thomas Young
加州大学戴维斯分校土木与环境
工程系，美国加利福尼亚州

摘要

本研究使用一种大范围疑似物筛查工作流程，来鉴定废水出水中的有毒化学物质。该全面的分析方法将靶向和非靶向方法相结合，使用在多种电离模式下运行的高分辨率精确质量数 Agilent 7250 GC/Q-TOF、Agilent MassHunter 定量分析软件 10.1 中的 GC/Q-TOF 筛查工作流程以及农药和环境污染物的 GC/Q-TOF 精确质量谱库。

前言

鉴定废水出水中的有毒化学物质是改善下游生态系统中环境水质的关键步骤。传统的靶向分析方法因适用范围有限，通常不足以鉴定毒性来源。通常采用非靶向分析的全面筛查有助于解决这一问题，并更深入地了解可能的毒性原因。为全面表征环境样品中的化学物质，需要将 LC 和 GC 分离技术与高分辨率质谱 (HRMS) 联用。否则，如果仅关注 LC/MS，则可能会遗漏这些样品中存在的许多非极性和挥发性化合物。GC/HRMS 的精确质量数以及软电离能够为未知物的鉴定或 NIST 谱库中初步匹配结果的验证提供重要的优势。

本研究将大范围疑似物筛查以及用于农药和环境污染物的非靶向方法相结合，使用高分辨率 GC/Q-TOF 分析技术鉴定废水出水样品中的有毒化学物质。

实验部分

样品

废水出水样品 (94940、94941、94943 和 94944) 在连续五天的第 1 天、第 2 天、第 4 天和第 5 天采集，每个样品一式两份。前两个样品表现出对模糊网纹蚤 (*Ceriodaphnia dubia*) 的急性毒性，如排水综合毒性 (WET) 测试结果所示。

样品通过 GF/F 过滤器 (0.45 μm) 过滤，流经亲水反相固相萃取柱。用乙酸乙酯和甲醇洗脱干燥的萃取柱。在超声浴中用己烷/丙酮 1:1 萃取干燥的过滤器。

将两种提取物混合，加入二溴八氟联苯 (DBOFB) 作为内标。

使用与 Agilent 8890 GC 联用的高分辨率 7250 GC/Q-TOF 对样品进行分析，其中 GC 采用 15 \times 15 m 柱中反吹配置 (图 1)。利用 20 分钟保留时间锁定 (RTL) 方法 (将甲基毒死蜱的 RT 锁定至 9.143 分钟)，确保与农药和环境污染物的 GC/Q-TOF 精确质量谱库的 RT 保持一

致。该方法所用的反吹有助于保持一致的 RT，避免交叉污染，延长色谱柱寿命，并减少离子源污染。

在电子轰击电离 (EI) 和负离子 CI (NCI) 模式下对样品进行筛查，确保废水出水中常见的拟除虫菊酯和其他卤代化合物获得最佳分析灵敏度。随后利用正离子 CI (PCI) 辅助化合物鉴定，因为它有助于形成分子离子加合物。分析条件如表 1 所述。

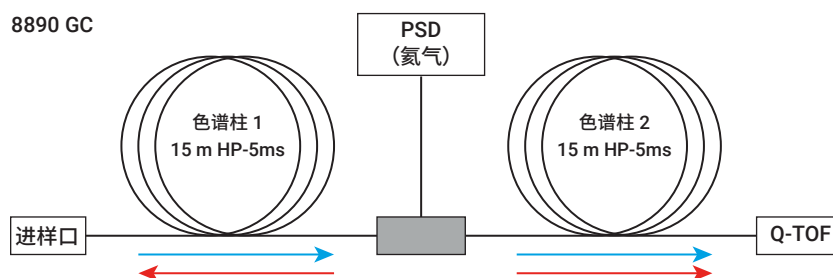


图 1. 柱中反吹配置。运行结束时反吹过程中的氮气流路以红色箭头指示。吹扫两通接头处的压力升高，而进样口的压力下降。这导致第一根色谱柱中的载气流向反转，并能通过分流出口除去高沸点化合物。气路反吹模块 (PSD) 是 Agilent 8890 GC 气路控制模块，提供了反吹功能，同时大大减少了载气消耗量

表 1. GC/Q-TOF 采集参数

GC 和 MS 条件	EI	负离子 CI	正离子 CI
GC	Agilent 8890 GC		
色谱柱	2 根 HP-5ms UI, 15 m, 0.25 mm, 0.25 μm 色谱柱		
进样口	MMI, 4 mm UI 单细径锥衬管, 带玻璃毛		
进样量	1 μL		
进样模式	冷不分流		
进样口温度	60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 0.2 分钟, 以 600 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率升至 320 $^{\circ}\text{C}$		
柱温箱升温程序	60 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 分钟; 以 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 170 $^{\circ}\text{C}$; 以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 310 $^{\circ}\text{C}$; 保持 3 分钟		
载气	氮气		
色谱柱 1 流速	约 1.2 mL/min		
色谱柱 2 流速	约 1.4 mL/min		
反吹条件	5 min (后运行), 310 $^{\circ}\text{C}$ (柱温箱温度), 50 psi (辅助 EPC 压力), 2 psi (进样口压力)		
传输线温度	280 $^{\circ}\text{C}$		
质量数范围	m/z 50–650		
谱图采集速率	5 Hz		
四极杆温度	150 $^{\circ}\text{C}$		
离子源温度	280 $^{\circ}\text{C}$	150 $^{\circ}\text{C}$	280 $^{\circ}\text{C}$
电子能量	70 eV	250 eV	100 eV
发射电流	5 μA	10 μA	15 μA

疑似物筛查工作流程

在 EI 模式下采集的 GC/Q-TOF 数据首先用 MassHunter 定量分析软件 10.1 中提供的 GC/Q-TOF 筛查工作流程进行处理。目标物列表基于经全面优化的精确质量数农药个人化合物数据库与谱库 (PCDL)，该 PCDL 中包含 1000 多种独特的化合物。为提高数据处理速度和质量，在分析之前将 GC/Q-TOF 数据转换为 SureMass 格式。筛查方法由 GC/Q-TOF 农药和环境污染物 PCDL 自动创建，共使用七个最具特异性的精确质量离子及其在每个谱图中的比率。筛查方法参数根据 SANTE^[1] 和 FDA^[2] 指南进行设置，包括 RT 窗口、质量数准确度和谱库匹配得分等。

非靶向鉴定工作流程

在非靶向分析方法中，利用 MassHunter 定量分析软件 10.1 中的未知物分析工具对 EI 数据进行处理。在特征查找步骤之后，执行 NIST17 谱库搜索，并在 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 中进行差异分析，以鉴定与废水出水样品更高毒性相关的化合物。为进一步鉴定非靶向筛查中的未知化合物或需要验证其特性化合物的分子离子，将 MassHunter 定性分析软件 10 的分子式标注工具与 EI 和正离子化学电离 (PCI) GC/Q-TOF 配合使用。

为了将 NCI GC/Q-TOF 数据与 GC/Q-TOF 筛查工作流程配合使用，基于在 NCI 模式下采集的谱图创建更聚焦的 (约 120 种化合物，如拟除虫菊酯) 精确质量数 PCDL。

然后，使用相同的 GC/Q-TOF 筛查工具对 NCI 数据进行处理。

结果与讨论

EI 模式下的疑似物筛查

使用高分辨率 GC/Q-TOF 分析对模糊网状蚤表现出不同程度的急性毒性 (0%–80%) 的废水出水样品。利用 MassHunter 定量分析软件 10.1 中提供的筛查工作流程

(图 2) 监测 GC/Q-TOF PCDL 中包含的许多重要农药和环境污染物的。

使用该工作流程，通过 EI GC/Q-TOF PCDL 在各种废水出水提取物中鉴定出 90 多种化合物，质量数准确度 < 5 ppm，谱库匹配得分 > 75。图 3 显示了 EI 筛查窗口以及报告的示例。在筛查工作流程中自动得到验证的化合物标记为绿色。

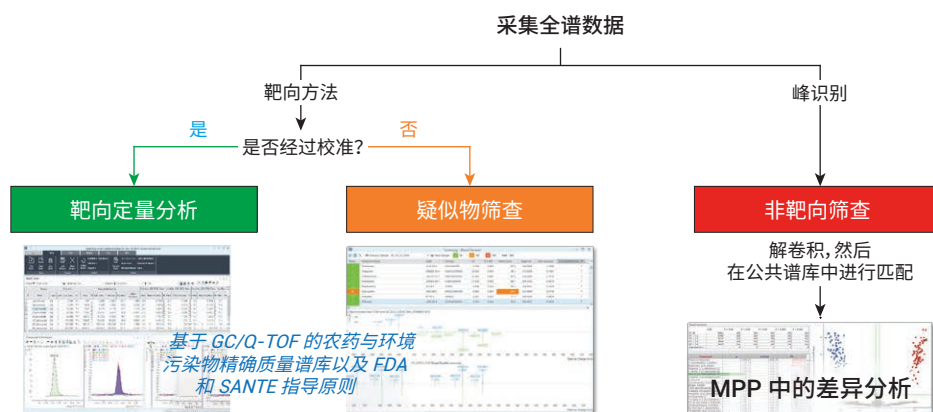


图 2. 组合污染物筛查工作流程基于使用 GC/Q-TOF PCDL 的靶向疑似物筛查方法和使用 NIST 谱库的非靶向筛查方法，所有筛查均采用 Agilent MassHunter 定量分析软件 10.1

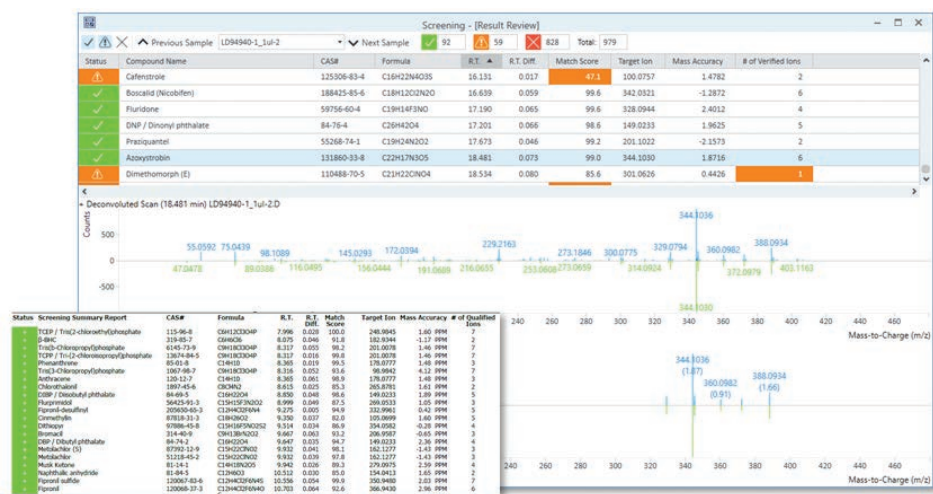


图 3. Agilent MassHunter 定量分析软件 10.1 中基于 EI PCDL 的筛查。自动验证的化合物标记为绿色。需要额外审查的化合物标记为橙色。下方显示了一个部分报告示例

需要进行额外手动审查的化合物标记为橙色。这些初步匹配结果（以橙色突出显示）即使只含一个失败的参数（例如谱库匹配得分或经验证的离子数量），也可能是假阳性结果，除非它们的谱图中只有少数（而非选择性）离子或具有较低的响应。GC/Q-TOF 疑似物筛查工作流程具有很高的灵活性，因此分析方法可以针对这些挑战性化合物进行专门优化。

在 GC/Q-TOF 筛查中鉴定出的化合物在不同样品之间表现出略有不同的响应水平，按其造成的模糊网纹蚤死亡率 (%) 分组列于表 2 中，其中某些化合物可能需要作为毒性诱因进行研究。

废水出水样品的 NCI 分析

在 NCI 模式下对前文所述的废水出水提取物进行分析，以确保卤代污染物及其他含有吸电子基团的化合物获得最佳分析灵

敏度。NCI 数据用相同的 GC/Q-TOF 筛查工作流程进行分析。创建了包含卤代硝基化合物及其他含有电子俘获基团的污染物更具体的 NCI 谱图 PCDL，以便在 NCI 模式下使用 GC/Q-TOF 筛查方法。平均而言，使用 NCI 模式和 NCI PCDL 能够在各种废水出水中可靠鉴定出约 40 种化合物。图 4 和表 3 显示了 NCI 筛查结果。尽管少数化合物只有一种主要离子或同位素簇并可能需要通过额外工作进行确认

表 2. 由 EI 疑似物筛查得到的选定结果。响应值基于样品之间的相对水平进行颜色标记。还显示了定量离子的质量数误差以及谱库匹配得分

样品	死亡率 80%						死亡率 20%						死亡率 0%					
	LD94940-1			LD94940-2			LD94941-1			LD94941-2			LD94943-1			LD94943-2		
	响应	质量数误差	谱库匹配得分	响应	质量数误差	谱库匹配得分	响应	质量数误差	谱库匹配得分	响应	质量数误差	谱库匹配得分	响应	质量数误差	谱库匹配得分	响应	质量数误差	谱库匹配得分
TBEP/磷酸三(2-丁氧基乙基)酯	2013504	2.8	99.9	1502528	3.9	99.9	1289372	2.5	99.9	1559301	3.8	99.9	787113	3.1	99.9	784473	3.8	99.9
磷酸叔丁基苯二苯酯	16799	2.1	92.9	4948	3.2	74.6	2828	1.1	82.5	10468	0.8	91.9	2950	1.3	70.6	2766	0.8	91.9
氯虫苯甲酰胺	6298	0.2	76.8	5330	2.0	79.4	3572	1.7	63.2	3494	1.8	66.4	3458	1.1	52.4	2710	1.8	66.4
氟啶醇	16518	1.3	80.4	15240	0.5	76.4	10698	2.6	73.7	12065	2.1	80.2	6038	2.0	74.2	4976	2.1	80.2
多效唑	16985	0.9	96.8	15763	1.6	98.7	10725	0.9	92.4	12090	2.1	94.9	9106	1.8	79.1	8448	2.1	94.9
TBZ/噁菌灵	1570235	1.4	99.7	1536170	2.4	99.7	1282402	0.6	99.7	1368732	2.2	99.8	774093	0.6	99.7	675439	2.2	99.8
噁菌酯	134463	1.8	99.1	139960	3.0	98.9	109579	1.4	98.9	119004	1.7	98.8	104804	1.7	89.9	94511	1.7	98.8

表 3. NCI 疑似物筛查结果

样品	94940-1		94940-2		94941-1		94941-2		94943-1		94943-2	
	响应	谱库匹配得分	响应	谱库匹配得分	响应	谱库匹配得分	响应	谱库匹配得分	响应	谱库匹配得分	响应	谱库匹配得分
溴氟菊酯	16837	71.4	14202	42.7	6474	83.7	4138	36.3	3253	56.5	4294	36.3
硫丹硫酸酯	3372	98.8	3013	91.9	12182	98.9	11865	99.1	18103	98.8	15859	99.1
氟虫腈	1184481	99.4	989538	99.3	1058932	99.4	898204	99.3	1218463	99.4	1089462	99.3
毒虫畏	22450	94.7	13196	86.3	16668	94.4	14469	94.7	14757	95.7	12834	94.7
氟虫腈	1312800	98.7	1269915	97.7	1255881	97.1	1307988	96.8	1519654	95.8	1350814	96.8
氟虫腈亚砷	201344	99.9	192041	100.0	224062	100.0	218654	100.0	241255	100.0	274001	100.0
氯酞酸甲酯	1730		1409	94.1	1468	94.3	1489	96.2	2204	80.0	1807	96.2
三唑酮	22376	94.1	16547	94.2	19705	96.0	17006	96.4	18710	97.2	16675	96.4
马拉硫磷	474	86.6	249	86.6	0	-	0	-	0	-	0	-
氟甲腈	128886	97.8	111722	97.8	122423	97.8	119001	97.9	164450	97.8	135773	97.9
百菌清	23789	99.4	12226	99.2	14367	99.0	15765	99.1	14714	99.2	12680	99.1
β-BHC	36573	88.4	19696	91.7	25594	81.4	19439	84.7	23983	69.4	13527	84.7
氯硝胺	30089	92.3	33303	93.2	34005	92.6	39632	93.8	44118	95.1	35911	93.8
六氯苯	13573	99.3	10353	99.6	11863	99.3	9934	99.1	14371	98.7	12048	99.1
氟乐灵	10334	86.6	11119	94.1	12089	94.2	11454	92.8	13550	94.5	9293	92.8
2,4-二硝基甲苯	81406	90.1	91627	89.0	75770	84.4	67256	83.3	43423	91.1	41979	83.3
2,4,6-三氯苯酚	2551498	92.2	2250861	91.6	2525758	91.5	2544336	91.4	2707308	91.2	2736603	91.4

(图 4A)，但是在甲烷 NCI 模式下，大多数化合物产生的碎片足以用于 PCDL 筛查工作流程 (图 4B)。因此，只要提供相应的 PCDL，该 GC/Q-TOF 筛查工作流程也可应用于 NCI 数据。

使用 EI 和 NCI 筛查方法在废水出水样品中鉴定出许多环境污染物，其中包括许多农药。但是，在废水出水样品中鉴定出的大多数化合物 (包括氟虫腈和氟虫腈降解产物) 没有毒性 (表 3)，不太可能是表现出的毒性的来源。

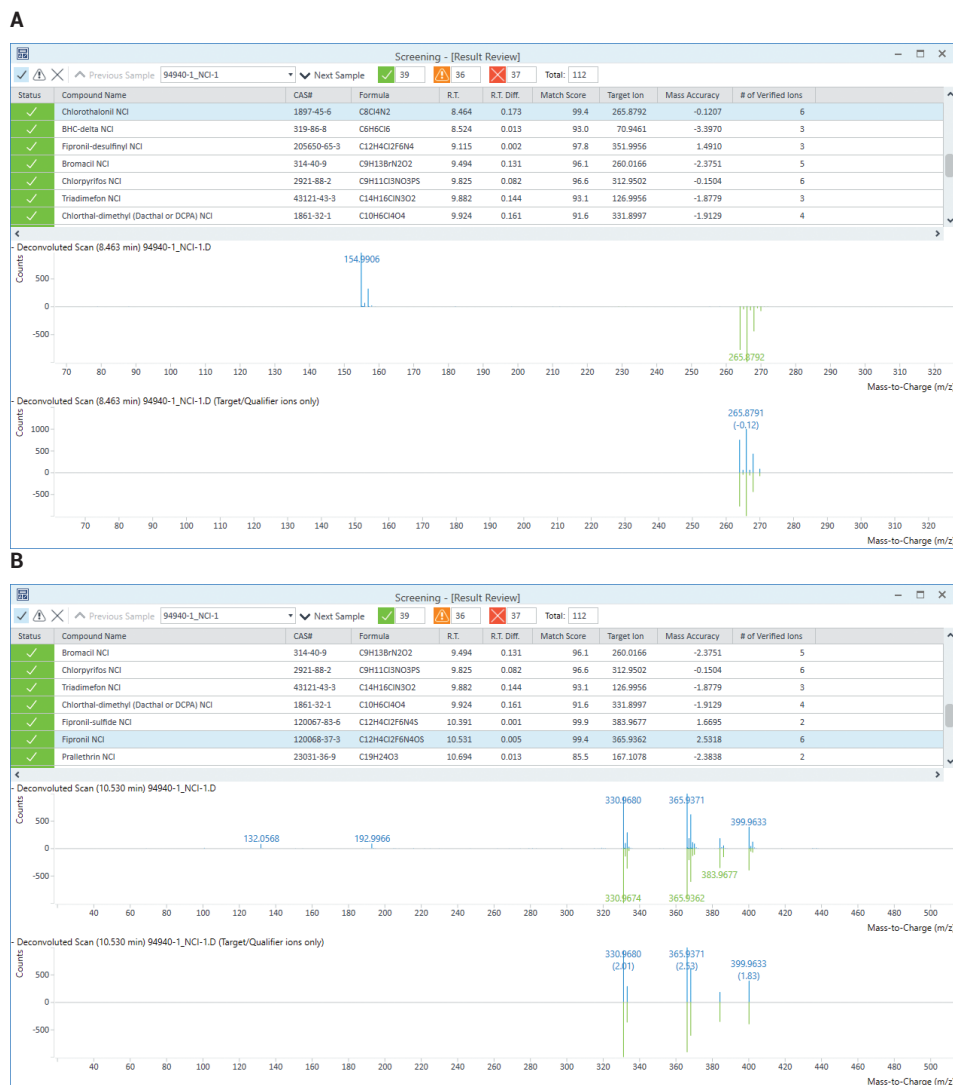


图 4. 在 NCI 模式下使用疑似物筛查鉴定出的化合物示例。下方的镜面图显示了利用筛查算法选择的大多数特定离子的光谱匹配结果。A) 具有极简单 NCI 谱图的匹配结果。B) 在 NCI 谱图有足够数量离子供确认的匹配结果示例

废水出水样品的非靶向分析

为鉴定可能与废水出水毒性增加有关的其他污染物，使用非靶向工作流程对数据进行处理。该方法包括在未知物分析工具中进行特征查找，执行 NIST 17 谱库搜索，然后在 MPP 中进行差异分析，以鉴定存在于表现出较高毒性的样品中更重要的化合物（图 2）。

将已鉴定和未鉴定的组分从未知物分析工具中导出为化合物交换格式 (.CEF) 文件，并导入 MPP 中。主成分分析 (PCA) 图表明，这些组分清晰地分为三组，分别对应于三种毒性不同的废水出水（图 5）。

倍数变化与统计显著性的火山图有助于显示大型数据集的变化，在本研究中用于快速检测死亡率为 80% 和 0% 的化合物组之间的差异（图 6）。与导致模糊网纹蚤零死亡率的废水出水提取物相比，导致模糊网纹蚤表现出 80% 死亡率的废水出水中存在许多含量明显更高的化合物。这些化合物可见于火山图的右上角，显示为红色。

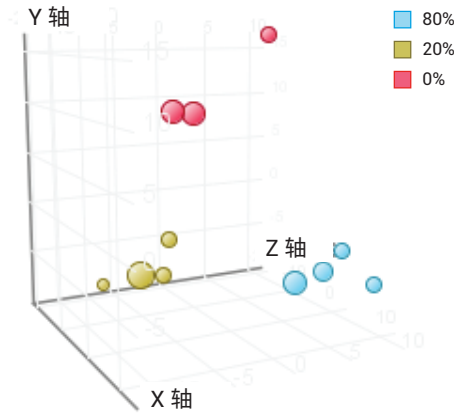


图 5. PCA 图，显示根据废水出水提取物的毒性将其清晰地分为三组

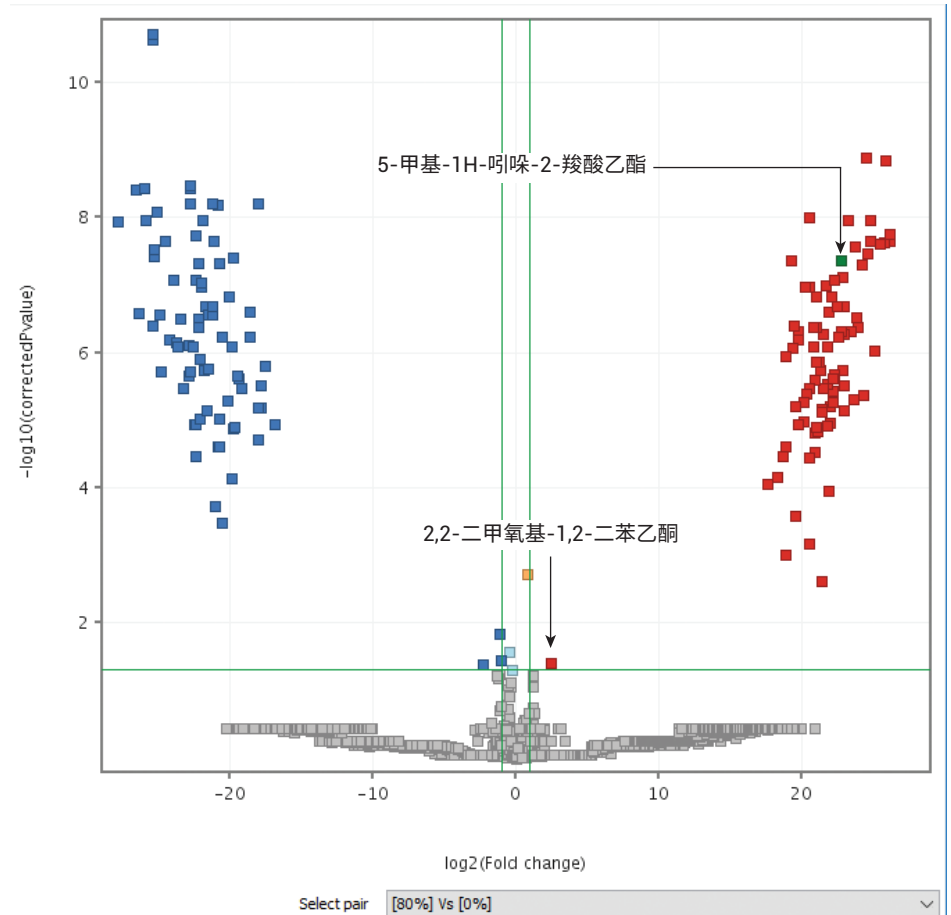


图 6. 火山图，对死亡率为 80% 与死亡率为 0% 的化合物组进行比较。火山图右上角以红色方块标记的化合物是废水出水中含量明显较高的化合物，通过比较死亡率为 80% 的化合物组与死亡率为 0% 的化合物组而得出

为进一步考察废水出水的毒性与提取物中初步鉴定出的化合物之间的相关性，实施了相关分析。在倍数变化 (FC) 截止值为 2 且 $p < 0.05$ 条件下得到所有三个排水毒性组的 FC 分析结果，将这些结果用作相关分析的实体列表 (图 7A)。选择死亡率百分比作为筛选参数。选择截止值为 0.6 的 Pearson 相似性指标，仅显示具有强相关性的化合物 (图 7B 和图 7C)。请注意，选择火山图和相关分析初步鉴定出的几种化合物 (图 6 和图 7C) 进行进一步的化合物 ID 确认，如下一节所述。

初步匹配结果验证与未知物鉴定

利用未知物分析工具中的 ExactMass (碎片分子式标注) 功能，确认废水出水毒性相关化合物的特性 (图 8A 和图 8B)。考虑到初步匹配结果的分子式，使用 NIST 17.L 谱库初步鉴定为 2,2-二甲氧基-1,2-二苯乙酮的化合物 (谱库匹配得分为 85.9) 的所有碎片离子均表现出较小的质量数误差 (图 8A)。由于第二种目标化合物碎片的 m/z 与初步匹配结果的分子式不匹配，因此该化合物鉴定错误 (图 8B)。由于该化合物的 EI 谱图未提供任何可检测的分子离子，因此使用 PCI 帮助鉴定分子离子，并结合 MassHunter 定性分析软件的碎片分子式标注工具推测该未知物的分子式 (图 8C)。PubChem 数据库建议该化合物的结构对应于乙酰柠檬酸三乙酯 (图 8C)，该结构与乙酰柠檬酸三乙酯的分子式相关性最高^[3]。

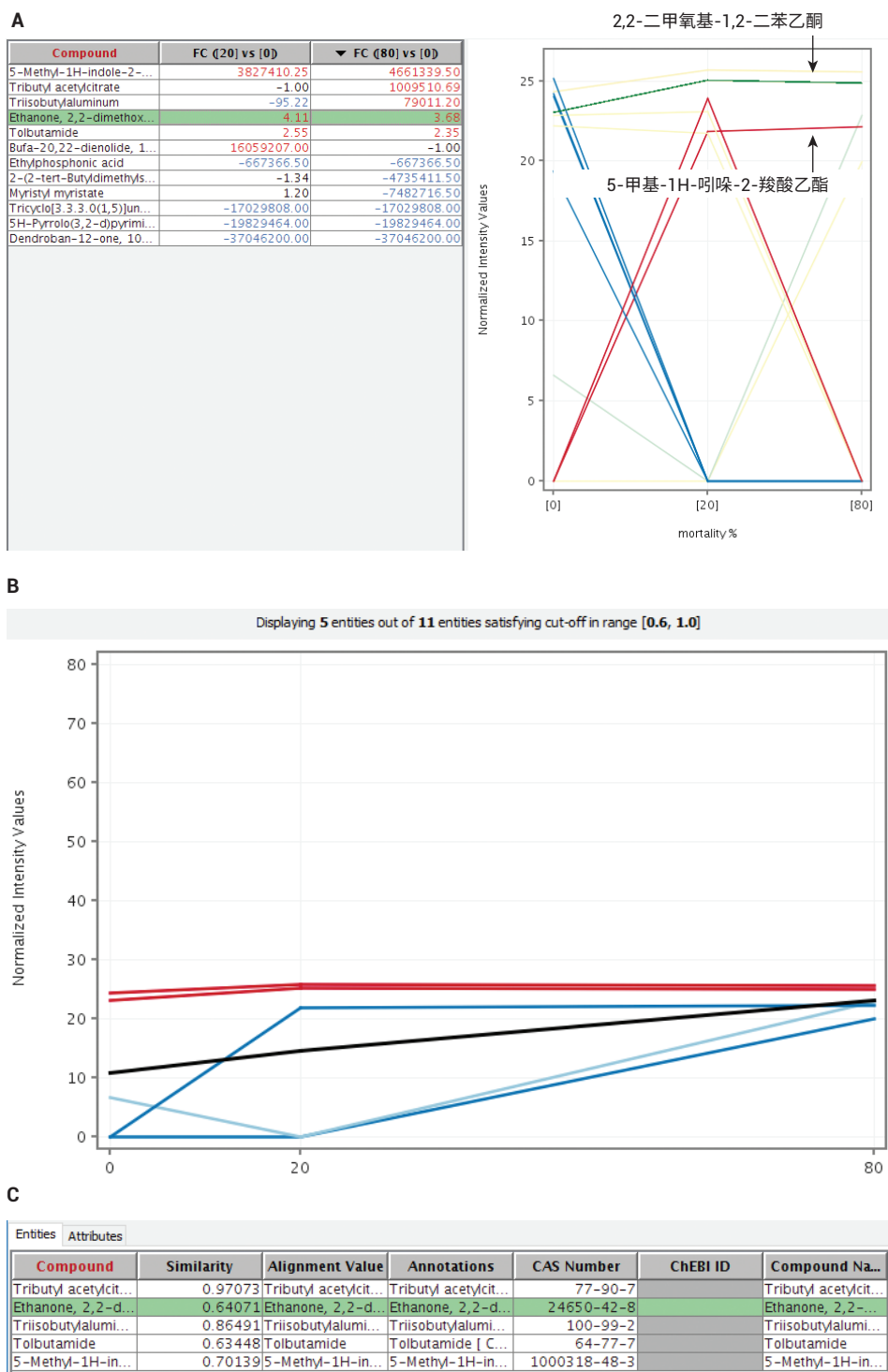


图 7. 在 Agilent MPP 中进行相关分析。A) 三个废水出水样品之间的倍数变化 (FC) 分析；B) 对参数输出进行筛选；C) 使用 0.6 的相似性截止值进行相关分析所得的化合物列表

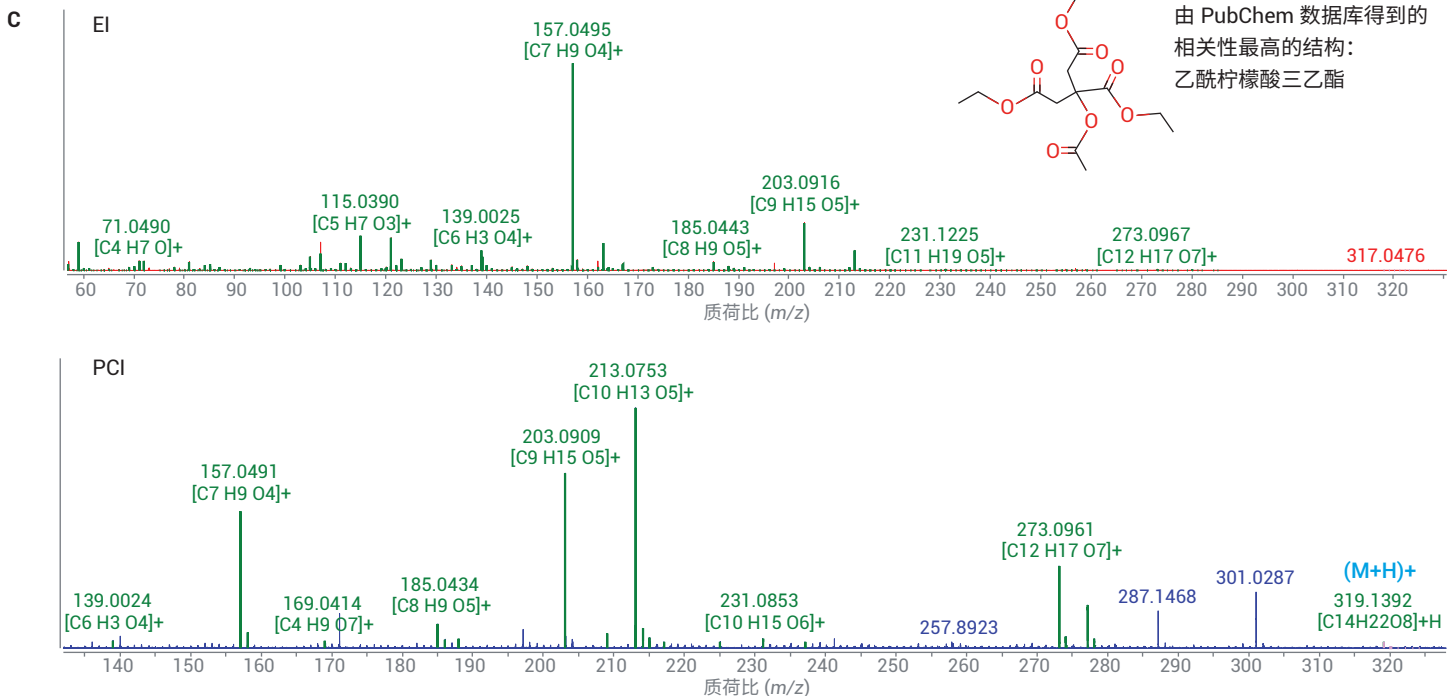
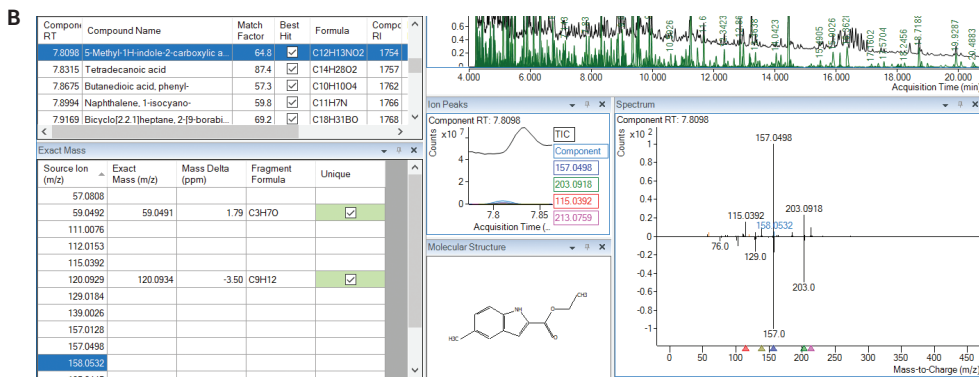
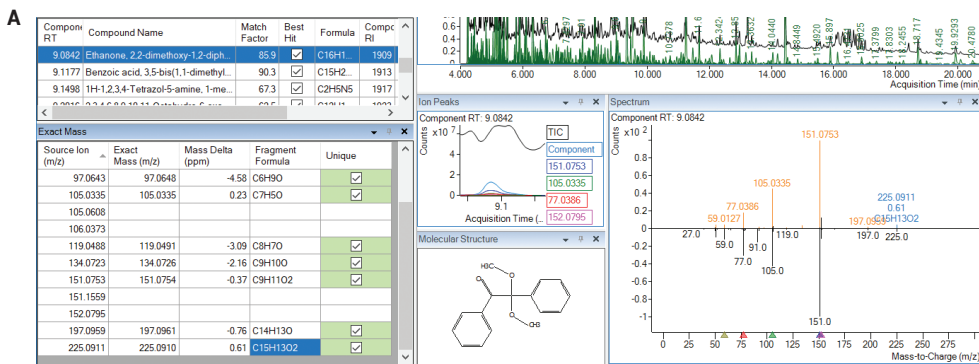


图 8. 利用具有 ExactMass 功能的未知物分析工具进行化合物验证和鉴定: (A) 已确认的 ID, (B) 已拒绝的 ID, 以及具有被拒绝 ID 的化合物 EI 谱图 (C, 上图) 和 PCI 谱图 (C, 下图) 在 Agilent MassHunter 定性分析软件中的碎片分子式标注

结论

使用 Agilent 7250 GC/Q-TOF 展示了一种将 EI 和 NCI 环境污染物疑似物筛查与非靶向筛查结合使用的方法。在样品中主要鉴定出的与某种程度毒性相关的一些目标化合物包括咪啉醇、多效唑、啉菌酯和氯虫苯甲酰胺等农药。

非靶向方法有助于鉴定可能与模糊网纹蚤死亡率相关的其他化合物。与疑似物筛查方法不同，虽然非靶向方法不太可能检测到痕量化合物浓度的细微差异，但它能够发现超出精确质量数 PCDL 范围的潜在污染物。

参考文献

1. SANTE/11945/2015. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed (**2015**)
2. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Memorandum: Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data within the Office of Foods and Veterinary Medicine (**2015**)
3. Kim, S. *et al.* PubChem 2019 Update: Improved Access to Chemical Data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47(D1)*, D1102-1109

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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，2019
2019年9月16日，中国出版
5994-1345ZHCN

