

## 处理前后的饮用水筛查的两种非靶向流程

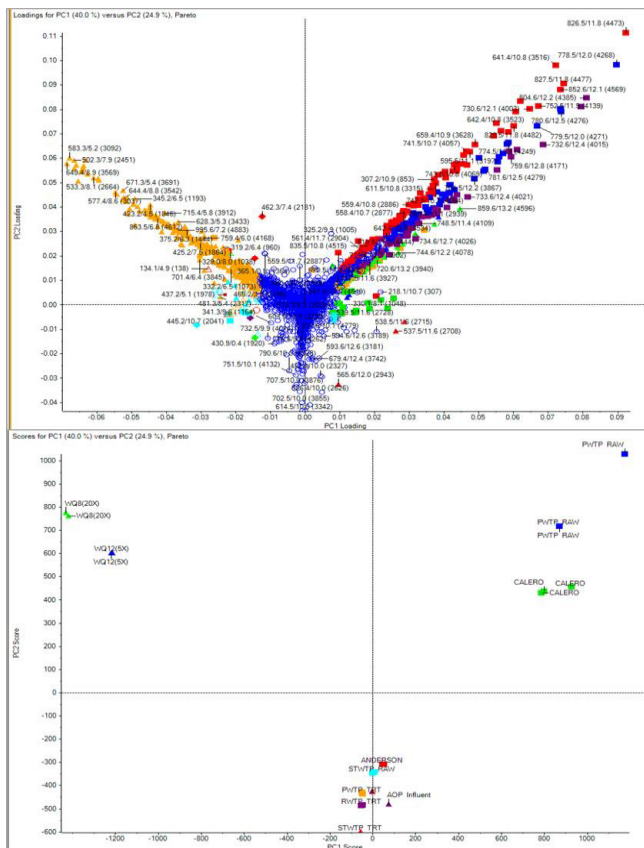
# Two Nontargeted Screening Approaches for Examination of Drinking Water Before and After Treatment

KC Hyland<sup>1</sup>, Amy Heffernan<sup>2</sup>

<sup>1</sup> SCIEX, 美国; <sup>2</sup> SCIEX, 澳大利亚

<sup>1</sup> SCIEX, USA; <sup>2</sup> SCIEX, Australia

本文通过液相色谱和四极杆飞行时间质谱联用系统 (LC-QTOF), 采用两种工作流程对饮用水处理流程中的原水和处理后的水中的未知物进行筛查和鉴定。未知物结构由实验采集的高分



**图1. MarkerView中的TOF MS数据 (正离子模式)。**载荷图和PCA (主成分分析) 图在样品组间差异上能提供非常有用的信息。载荷图 (上): 利用MLR方法对数据进行归一化。每个点代表一个特征峰, 不同的颜色代表不同的样品组。PCA图 (下) 显示了不同样品在主成分1和主成分2的图 (PC1 vs PC2) 上聚集。PC1 vs PC2图展示的是导致样品组间显著不同的两个最大变量。

辨质谱一级质量数和二级谱图共同确定 (确定方法包括搜库和电脑模拟碎片解析)。数据的采集运用了创新的一针进样同时进行数据非依赖采集 (SWATH®采集技术) 和数据依赖采集 (IDA) 的模式。样品中未知物的筛查范围包括缓蚀剂、人工甜味剂和药物。实验表明原水、处理过的水和深度处理过的水中的组分是不同的。高分辨率质谱的数据与结合了统计学软件的非靶向数据处理流程是实现未知物结构鉴定的关键。文中所述第一个工作流程是疑似物筛查流程, 主要通过二级谱库搜索同时鉴定所有化合物。第二种方法则是先通过统计学方法找出重要的有差异的化合物, 然后再对找出的差异化合物进行谱库搜索。

### 非靶向筛查流程的主要优势

- 两种方法均使用了SWATH®采集技术, 此技术可保证样品中所有可检测到的化合物被采集到二级谱图。
- 利用SCIEX All-in-One二级谱库并结合NIST库进行筛查, 可获得大的化合物覆盖率。而大的覆盖率则意味着更多的化合物能获得可能的结构, 从而减少了需要手动进行结构鉴定的情况。
- MarkerView软件可用于识别出不同样品中的特征物质。这个软件中的统计工具可以对样品组间的差异进行细致的分析, 并对复杂的未知物组成进行表征。

## 实验部分

**样品和样品制备:** 本实验对几种不同的水进行了微量有机成分的筛查。

1. 高级氧化法 (AOP) 进出口: 高级氧化技术处理前后的水
2. 安德森, 卡莱罗: 来自加利福尼亚两个不同水库的水
3. WQ12: 微滤膜过滤后 / 反渗透之前的水 (RO)
4. WQ12: 反渗透装置的反冲水
5. PWTP或STWTP原水: 从两个不同的水处理厂 (“P”或“ST”) 中的一个取样的饮用水处理进口水。这个进口水来源于水库。
6. PWTP or STWTP TRT: 从两个不同的水处理厂 (“P”或“ST”) 中的一个取样的饮用水处理出口水。

样品用Waters Oasis HLB固相萃取柱 (SPE) 进行浓缩。将收集的水样 (500mL) 加入到活化后的SPE柱中, 淋洗并洗脱。洗脱液氮吹至干, 复溶至100  $\mu$ L。然后用流动相稀释后进样分析。

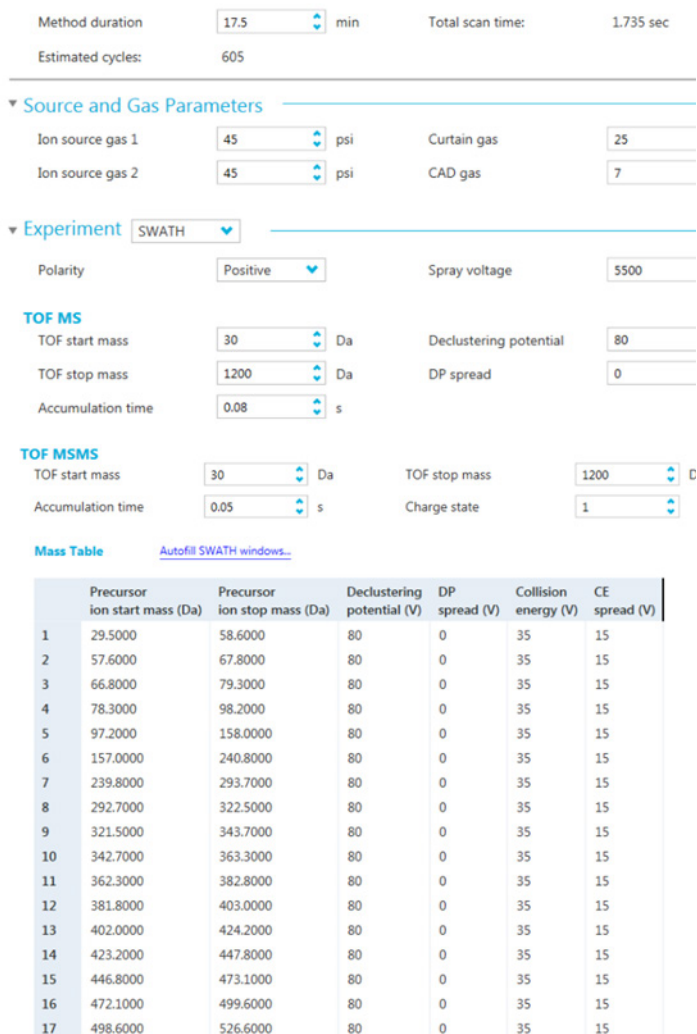
**色谱条件:** 利用ExionLC™ AD系统进行色谱分离, 色谱柱为Phenomenex Kinetex 2.6  $\mu$ m C18 100Å 100  $\times$  2.1 mm, 柱温30  $^{\circ}$ C。以一个16 min的梯度洗脱程序进行洗脱, 流动相A为含0.1%甲酸的水, 流动相B为含0.1%甲酸的甲醇。

**质谱条件:** 利用带Turbo V™离子源的SCIEX X500R QTOF LC-MS/MS系统进行检测, 电喷雾电离 (ESI) 模式。分别进样采集正电离和负电离模式数据。本实验采用SWATH采集模式来确保获得所有可检测到的离子的MS/MS质谱图, 并设置了可变的Q1窗口, 以确保在大部分样品组分所处的质量区间能够采集到更准确的MS/MS质谱图, 这是在高度复杂样品中应用SWATH采集技术的典型做法。图2为SWATH采集方法的具体设置。

**数据处理:** 利用SCIEX OS操作系统对数据进行搜库。用MarkerView软件对SWATH数据进行统计分析 (主成分变量分组 (PCVG) 的主成分分析 (PCA) 和t检验), 找出的差异化合物再利用SCIEX OS系统的Formula Finder功能推测可能的分子式。

### 方法一: 疑似物筛查

疑似物筛查或者叫疑似物靶向筛查是一种非靶向筛查流程, 在该流程中, 数据采集没有特定的目标物, 但采集到的数据将被用于进行一些预设的特定组分的筛查确证。这些特定组分有时被称为“已知未知物”——文献或质谱谱库中已知但未在本采集方



Method duration: 17.5 min      Total scan time: 1.735 sec  
Estimated cycles: 605

**Source and Gas Parameters**

Ion source gas 1: 45 psi      Curtain gas: 25  
Ion source gas 2: 45 psi      CAD gas: 7

**Experiment** SWATH

Polarity: Positive      Spray voltage: 5500

**TOF MS**

TOF start mass: 30 Da      Declustering potential: 80  
TOF stop mass: 1200 Da      DP spread: 0  
Accumulation time: 0.08 s

**TOF MSMS**

TOF start mass: 30 Da      TOF stop mass: 1200 Da  
Accumulation time: 0.05 s      Charge state: 1

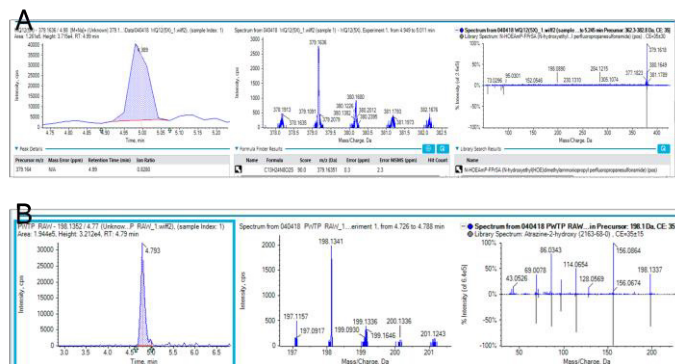
**Mass Table**      Autofill SWATH windows...

	Precursor ion start mass (Da)	Precursor ion stop mass (Da)	Declustering potential (V)	DP spread (V)	Collision energy (V)	CE spread (V)
1	29.5000	58.6000	80	0	35	15
2	57.6000	67.8000	80	0	35	15
3	66.8000	79.3000	80	0	35	15
4	78.3000	98.2000	80	0	35	15
5	97.2000	158.0000	80	0	35	15
6	157.0000	240.8000	80	0	35	15
7	239.8000	293.7000	80	0	35	15
8	292.7000	322.5000	80	0	35	15
9	321.5000	343.7000	80	0	35	15
10	342.7000	363.3000	80	0	35	15
11	362.3000	382.8000	80	0	35	15
12	381.8000	403.0000	80	0	35	15
13	402.0000	424.2000	80	0	35	15
14	423.2000	447.8000	80	0	35	15
15	446.8000	473.1000	80	0	35	15
16	472.1000	499.6000	80	0	35	15
17	498.6000	526.6000	80	0	35	15

**图2. 运用了可变窗口SWATH采集技术的非靶向采集方法。**从上到下的质谱参数包括离子源参数 (如温度、喷雾电压和气体流量)、TOF-MS参数 (如扫描范围和去簇电压DP) 和MS/MS采集参数。其中包括可变的一级质量窗口 (以前体离子开始/结束表示) 和二级碎片扫描范围。每个质量窗口也可以单独指定去簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE), 但在本次试验中, DP、CE以及他们的扩展值仍使用常规设置。

法中确证的化合物<sup>1</sup>。数据采集完成后, 成分的初步鉴定通过高分辨一级和二级数据与实际和理论数据库的匹配来实现 (图3)。这种方法的优点在于, 在没有标准品的情况下, 也可以通过二级谱库和电脑模拟碎片解析得到可能的结构。

采集的数据在SCIEX OS系统的Analytics模块进行处理。以空白萃取样品为对照, 非靶向处理方法中未知物查找的条件设置为: 化合物在未知样品中比在空白样品中响应至少高3倍。疑似物筛查中, 化合物鉴定的可信度可以用数据处理中的一级质量误差、二



**图3. 可疑物筛查流程。**利用可疑物筛查流程，本实验在不同水样中鉴定出多种可能的成分。非靶向的峰查找和后续的二级谱库搜索的结果包括（从左到右）：找到的色谱峰、TOF MS质谱图和相应的Formula Finder分子式预测结果，以及获得的该化合物的二级质谱图与与之匹配的搜库结果。在上述实例中，被鉴定出的化合物都有很高的匹配得分分数。A）在反渗透装置的反冲水中，通过与SCIEX 氟化物库Fluoros library v2.0进行二级匹配，鉴定到一种新型的全氟化合物N-HOEAmP-FPrSA。B）在水处理过程开始的原水中发现了一种普通三嗪类除草剂阿特拉津的转化产物。但母体化合物阿特拉津却未被检测到，因此这种变化可能是在到达取样的水处理厂之前的环境水中产生的。

级碎片匹配得分、保留时间（如果已知）以及同位素分布这些参数进行表征。SCIEX OS系统中，用户可以通过设定不同的容许范围来定义怎样才算“匹配”（显示为绿勾）方便用于快速、直观的进行筛查和标记。在本实验中，对于搜库，Purity得分 $\geq 70\%$ 的定义为二级匹配，质量误差 $\leq 2$  ppm的定义为与Formula Finder分子式预测结果一致。

## 方法二：统计分析

虽然可疑物筛查的工作流程直观易懂，方法设置和全面搜库也很简单，但往往会导致信息量过大，在多个样本或样本组之间进行比较可能会比较麻烦。基于这一点考虑，我们应用了第二个工作流程，其目的是首先缩小在未知样本中待鉴定的化合物列表。在这种方法中，我们利用MarkerView软件的统计学功能来对不同的水样进行表征。将高分辨率、准确的QTOF数据导入到MarkerView软件中，以寻找不同水样中的特征物质；然后将这些特征物质生成一个“兴趣峰”列表，配合SCIEX OS软件对这些特征峰进行鉴定。工作流程如图4所示。

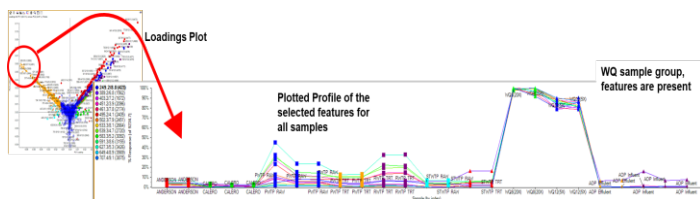


**图4. 基于统计学的工作流程。**在搜库之前，使用MarkerView软件挖掘最有显著性差异的数据。在这个工作流程中，目的只是鉴定那些可以区分不同类型样本的特征峰。

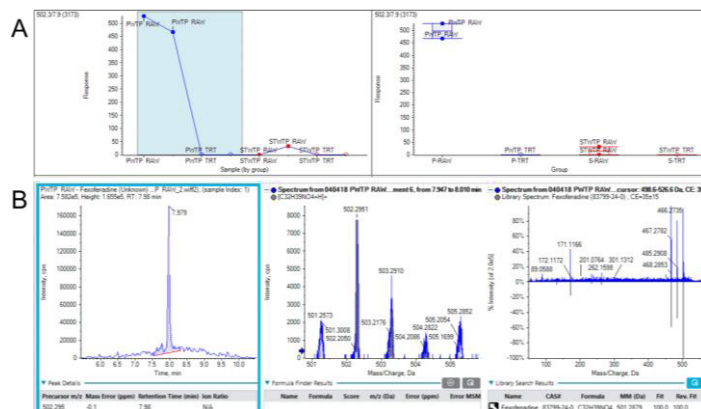
MarkerView软件是此工作流程的关键组成部分<sup>2</sup>。实验采集的所有样本的TOF MS数据都可以导入该软件中，然后该软件可以提取所有相关的特征峰（唯一的m/z和保留时间定义一个峰），并生成一个特征化合物列表，然后就可以在软件内进行各种统计分析。图1显示了不同水样PCA分析的得分和载荷图。从中可以清楚地看出，在基于这些特征峰画出的图上，样本组之间有明显区别。下一步就是进一步研究这些特性峰中哪些是一个或多个感兴趣的样本组所独有的。图5展示了一个这样的例子，图中提取了载荷图最末端的部分特征峰以生成一个组分分布图。在载荷图最末端的特征峰表示该PCA特征组最具特征性的物质（在这个例子中，表示在一个样本组中存在而在另一个样本组中相对不存在）。这一有价值的信息可以帮助我们生成一个特征峰列表，这个列表中的峰一旦被鉴定（初步或更严格的确认），我们就可以得到样本间的差异或变化的信息。

这项研究有一个明确的关注点，就是对“处理前”和“处理后”的样本组做比较。例如，PWTP原水与PWTP处理后水样的对比，或者AOP进口水与AOP出口水的对比。这些直接的对比旨在识别那些在处理过程中存在转化行为的痕量物质，哪些物质在处理过程中消失而哪些物质又在这个过程中生成。

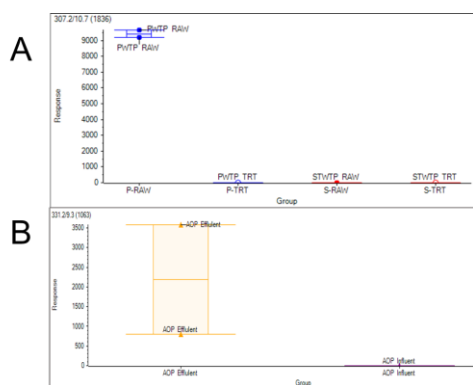
图6显示了两个经t检验表明在PWTP和AOP的“处理前”和“处理后”样本中存在显著差异的化合物。这些化合物就是会被添加到“兴趣峰”列表中，并进行定性研究的化合物示例。t检验也可以在MarkerView软件中进行，并且可以将任何样本组与另一个样本组或其余样本组进行比较。



**图5. 载荷图可以快速得到不同样本的特征组分。**本图将载荷图右上角圆圈中的峰单独显示出来。在这些特征峰的提取图中，图例显示了每个特征峰的特征标识（ $m/z$ 和保留时间），图中的点表示用特征峰对强度对它所在的样本作图。这部分特征峰在WQ样品组中的强度明显高于其他样品组。因此，这些特征峰被确定为WQ组水样的特征成分，值得被进一步研究。



**图7. “兴趣峰”列表中化合物的鉴定。**利用SCIEX OS软件对PWTP原水样品和处理后的水样之间的显著差异峰进行了结构匹配。A) 在PWTP原水中，特征峰 $m/z$  502.3 (RT 7.9 min) 的响应比PWTP处理后水样中更高。该化合物似乎在PWTP处理过程中发生了转化。B) 从左到右分别为：该化合物在7.9 min时的色谱峰；高分辨一级质谱图和预测的分子式 $[C_{32}H_{39}NO_4+H]^+$ ；该化合物的二级谱图和谱库中与之匹配的葑酮非那定的二级谱图。预测的分子式与葑酮非那定的分子式相匹配，并且碎片离子的匹配度极高（Fit得分为100）。



**图6. 箱形图显示了对比的样品组之间的单个特征峰的情况。**A) 在PWTP原水中，特征峰 $m/z$  307.2 (RT 10.7min) 比在PWTP处理后的水样中更高。该物质可能在PWTP处理过程中发生了转化。B) 高级氧化处理后的水样中的特征峰 $m/z$  331.2 (RT 9.3min) 中比处理前中更高。这种物质可能是在氧化过程中产生的。

一旦在MarkerView软件中利用统计工具生成了“兴趣峰”列表后，就可以在SCIEX OS软件中对这个目标列表进行数据处理。这些特征峰的处理遵循相同的疑似物筛查原则。高分辨率TOF MS数据用于生成特征峰可能的分子式，并利用搜库功能寻找匹配的结构。图7显示了一些由t检验产生的特征峰与候选结构的匹配情况。

## 总结

本实验分别使用两种高分辨质谱工作流程，对水在经过各种处理过程时的不同痕量有机成分进行表征。第一种是可疑物筛查

工作流程，这个工作流程首先通过样本与空白样品的比较，找出特征峰。然后通过对采集的二级谱图进行搜库得到匹配结果，完成对这些特征峰的初步鉴定。第二种工作流程有一个附加步骤，首先使用统计学软件将筛查峰列表缩小到与样本组最相关的范围。通过主成分分析（PCA）和t检验寻找特征差异峰，并将其添加到“兴趣峰”列表中。再对这些感兴趣的峰进行研究以获得可能的结构信息。

两种工作流程都是对水样中污染物进行非靶向筛查的有效方法。随着搜索参数、期望的特征峰提取的细致程度和样本复杂度的不同，可疑物筛查可以仅从单个样本就找到数千个特征峰用于筛查和鉴定。庞大的数据量使样本组之间关键差异物的寻找（例如，本实验中进水样品组和出水样品组之间的差异）变得更加困难，也给工作人员带来潜在的挑战。通过首先利用MarkerView软件找出显著差异峰的方式，工作流程变得更为合理，数据处理可以更侧重于样品中差异峰的鉴定。

这项研究的部分结果包括对收集到的废水样本中某些化合物的结构鉴定，以及一些关于可能发生转化的物质的有趣的发现。例如，在疑似物筛查方法中，一种按常规方法不会被检测到的氟化物N-HOEAmp-FPrSA在反渗透装置的反冲水中通过二级匹配被

初步确证。阿特拉津的代谢物2-羟基阿特拉津在PWTP的原水中被检测到，并通过可疑物筛查和二级匹配得到了初步确证。有趣的是，一些在PWTP原水中被初步鉴定的化合物似乎在处理过程中被移除或转化了，其中包括多种人用药物，比如图7所示的非索非那定，以及表氧雄龙（药物类固醇激素氧雄龙的代谢物）和阿普唑仑（镇静剂）。

综上所述，任何非靶向筛查或分析的最佳方法的选择在很大程度上取决于所研究的问题。如果需要复杂样本中的每个组分进行表征，那么直接对所有采集到的二级数据进行搜库并与合适的空白样本进行对比的可疑物筛查方法可能是最合理的。然而，如果更重要的问题是“这些样本集之间有什么不同”，那么，先利用统计工具缩小筛查列表可能是一个更有利和合理的工作流程。

## 致谢

SCIEX感谢Renee Huang和圣克拉拉谷水区为这项研究收集和准备水样。

## 参考文献

1. Schymanski, E. L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ru, M., Singer, H. P., Hollender, J. (2014) Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. 2097-2098.
2. A. Schreiber, N. Pace. Identifying Unexpected Environmental Contaminants with High-Resolution, Accurate Mass LC-MS/MS. LCGC Chromatography Online (2010).

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。AB SCIEX™ 商标经许可使用。© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.

RUO-MKT-02-8998-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808-1388  
传真：010-5808-1390  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419-7200  
传真：021-2419-7333  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)