

一项利用大气压气相色谱-分辨率质谱联用技术进行小规模孤立人群的非靶向暴露研究

Pierre Dumas, Lauren Mullin, Paul Goulding, Adam Ladak

Waters Corporation, Institut National De Santé Publique Du Québec,

摘要

在本研究中，我们采用暴露组学方法分析了生活在不同小型偏远沿海群体中个体的合并血浆样品，来确定这些群体之间在污染物的种类和浓度方面是否存在差异。将大气压化学电离气相色谱(APGC)与高分辨率质谱(HRMS)联用，在数据非依赖型采集(DIA)模式下分析样品，通过单次运行收集母离子和碎片离子信息。

暴露研究涉及复杂的数据以及数据集内的细微比较。利用APGC软电离技术，并在一种方法中采集母离子和碎片离子的精确质量数数据，可以生成完整的数据集。结合Progenesis QI软件的处理能力，可以快速轻松地执行复杂的统计分析。Progenesis QI还支持搜索数千个在线数据库和用户生成的数据库。这种硬件与软件的组合为暴露组学工作流程提供了一种简化的方法。

优势

- 生成低能量和高能量谱图的精确质量数测量值，可在单个数据集中进行靶向和非靶向数据分析。
- 使用APGC进行“软”电离，从而保留分子离子，再加上电离后的碎片离子，可产生非常详细的谱图。
- 集成的MVA和结构解析工具可通过自动元素组成、在线数据库搜索和结构归属来帮助鉴定目标标志物。

简介

人类暴露于环境污染物已经涉及到了各种健康问题。在分析已知的目标环境污染物（例如二噁英、PCB和PAH等持久性有机污染物(POPs)）时，需要采用靶向质谱法。近期的研究使用代谢组学方法来确定不同人群之间的暴露差异。“暴露组学”一词指的是考察可能对人体造成健康风险的各种污染物的研究。

在本研究中，我们采用暴露组学方法分析了生活在不同小型偏远沿海群体中个体的合并血浆样品，来确定这些群体之间在污染物的种类和浓度方面是否存在差异。将大气压化学电离气相色谱(APGC)与高分辨率质谱(HRMS)联用，在数据非依赖型采集(DIA)模式下分析样品，通过单次运行收集母离子和碎片离子信息。

此类研究的主要挑战之一是解析生成的大量数据。为了便于数据解析，研究中使用了Waters Progenesis Q1数据分析软件。首先，根据定义的污染物数据库进行靶向分析。然后，进行多变量分析(MVA)以确定群体之间的任何差异。使用Progenesis Q1软件表征未知污染物，搜索在线数据库并将结构信息与高能量数据进行匹配。最后，使用标准品确认了其中一个结果。

实验

样品前处理

取2 mL血浆，加标¹³C内标，并与乙醇和饱和硫酸铵溶液混合（用于变性）。然后用正己烷萃取样品。蒸干提取物并在florisil色谱柱(1 g)上进行纯化。用含25%二氯甲烷的正己烷溶液洗脱POPs。在GC-MS分析之前，可将纯化后的提取物用至多20 μL正己烷浓缩。该方案适合本研究，因为目标是研究POPs和类POPs化合物，而该方案旨在萃取和纯化与POPs化学属性相关的污染物（例如非极性亲脂分子）。

GC条件

GC系统:	A7890
色谱柱:	Rtx-5MS (Restek) 0.25 μm × 0.25 mm 0.25 μm
进样模式:	不分流

衬管:	去活化的鹅颈不分流衬管(Restek)
流量控制模式:	恒定流量
色谱柱流速:	2 mL/min
进样器温度:	280 °C
总运行时间:	37.7 min
数据管理:	UNIFI科学信息系统 Progenesis Q1

GC柱温箱温度梯度

温度(°C)	温度梯度 (°C/min)	保持时间(min)
80	-	1
125	25	0
340	8	8

质谱条件

质谱系统:	Xevo G2-XS QTof
电离模式:	API+
采集模式:	MS ^E

采集范围:	50~1000 <i>m/z</i>
碰撞能量(LE):	6 eV
碰撞能量(HE):	30~75 eV
扫描时间:	0.15 s
离子源温度:	150 °C
接口温度:	310 °C
电晕电流:	3.0 μ A
锥孔电压:	30 V
锥孔气流速:	200 L/h
辅助气体流速:	250 L/h
尾吹气体:	300 L/h
实时校正标准液:	聚硅氧烷(281.0512 <i>m/z</i>)

结果与讨论

分析样品之前，在系统上运行GC混标。混合物中含有氯化农药，其理化性质与目标POPs相似。由于产生的谱图是通过APGC和MS^F采集的，因此能够生成具有专属性且良好的谱图。得益于APGC产生的软电离，与传统EI+分析相比，低能量谱图几乎没有碎片。高能量谱图提供了可用于结构确证的碎片离子信息。图1所示为标准品中六氯苯的分析结果，展示了采用这种软电离技术产生的强母离子（低能量）和良好的碎片离子（高能量）。

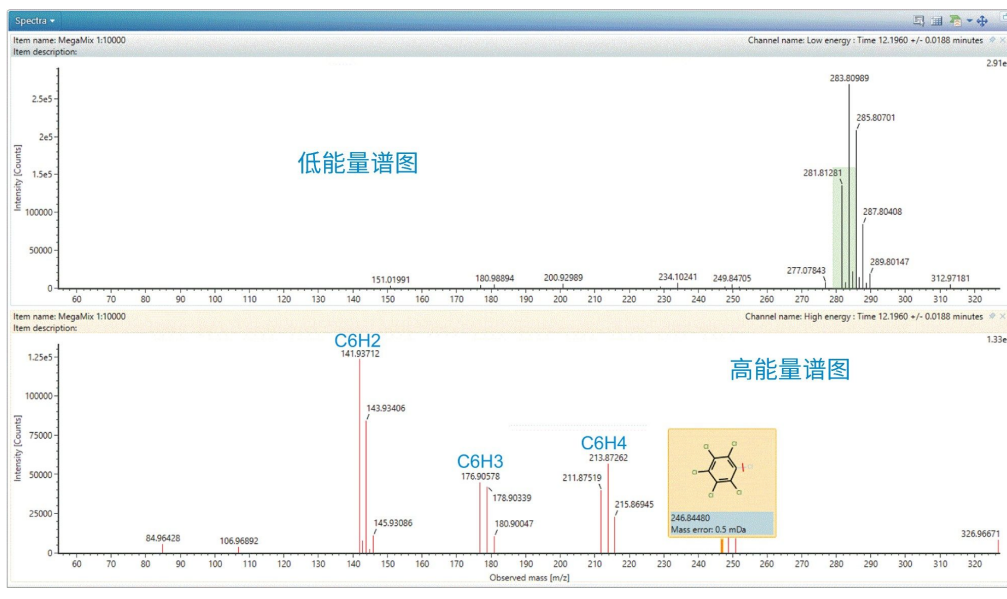


图1.六氯苯的 MS^E 谱图，显示了APGC的低能量碎片离子。

在系统上运行标准品并验证灵敏度和质量精度符合预期后，即可开始分析样品。将样品重复进样三次。通常情况下，在代谢组学实验中，样品会被随机化处理，防止因进样相同样品而产生任何化合物积聚，并考虑到仪器灵敏度随时间可能下降的问题。在本例中，样品溶于20 μ L挥发性物质正己烷中。如果在首次刺穿样品瓶隔垫后对样品进行随机化处理，则样品可能会因溶剂蒸发而浓缩，导致实验结果出现偏差。因此，我们决定按系列顺序运行样品。在UNIFI软件中完成样品数据的采集后，将数据转移到Progenesis Q1进行数据解析。

数据导入Progenesis Q1后，选择数据集中可能存在的加合物。根据APGC的电离机制，本研究选择了 M^+ 和 $(M+H)^+$ 。然后对运行结果进行自动对齐，以补偿在长时间运行中（例如在代谢组学研究中）的任何保留时间漂移。为确保所有数据文件中一致的峰提取和匹配，由对齐后的运行创建整合数据集，其中包含所有样品文件的峰信息，因此我们能够检测单个化合物的离子图。然后将该图应用于每个样品，得到100%匹配的峰，没有缺失数值，这样有助于多变量统计分析。

靶向分析

在包含98种预期化合物母离子和碎片离子信息的MetaScope数据库中，搜索数据集中存在的所有样品。搜索参数如图2所示，采用5 ppm质量误差、1分钟的保留时间窗口和2 mDa的碎片离子质量误差来确定鉴定结果。混合血浆样品中出现了24个阳性结果。图3展示了鉴定出的化合物以及化合物中丰度最高的样品。需要注意的一点是，群体1检出的POPs丰度似乎较高。这个群体可能特别值得进一步调查，以寻找其他非靶向化合物。

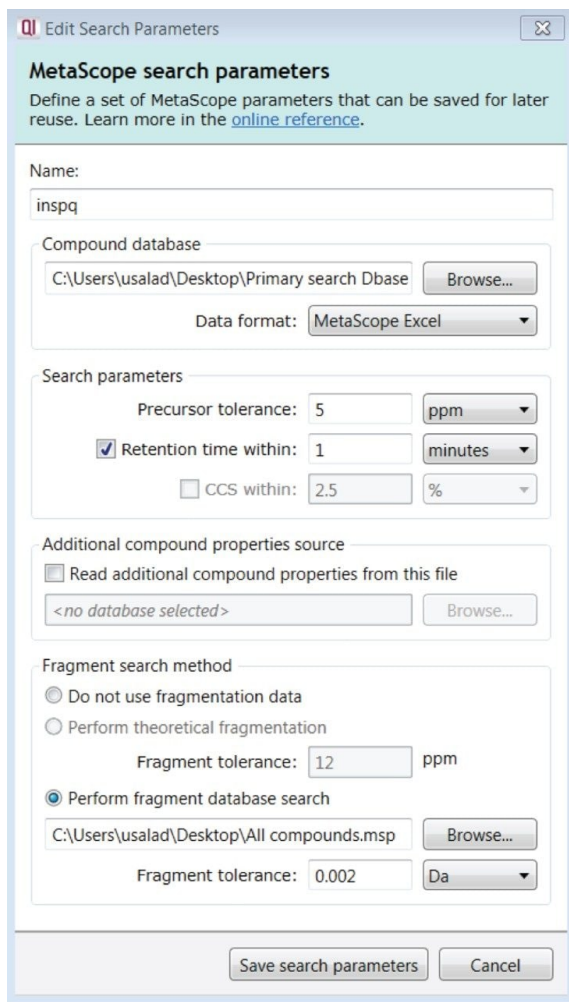


图2. Progenesis Q1软件中的MetaScope搜索参数

。

化合物	认可的鉴定结果	m/z	保留时间	峰宽	鉴定	Anova (p)	q值	最大倍数变化	最大平均数
9.5_152.0626 m/z	萜烯	152.0626	9.50	0.33	1	0.002	0.004	1.836	群体4
10.40_154.0771 m/z	萜烯	154.0771	10.40	0.09	1	0.658	0.666	11.849	群体2
12.26_283.8095 m/z	六氯苯	283.8095	12.26	0.11	1	6.39E-07	2.89E-06	2.502	群体1
13.35_178.0775 m/z	蒎	178.0775	13.35	0.14	2	7.49E-05	1.99E-04	2.087	群体5
16.67_202.0774 m/z	蒎	202.0774	16.67	0.08	1	3.00E-03	6.00E-03	2.073	群体1
17.23_325.8795 m/z	PCB 99	325.8795	17.23	0.09	2	1.96E-04	4.64E-04	1.972	群体1
17.28_202.0776 m/z	蒎	202.0776	17.28	0.09	1	1.60E-02	2.40E-02	1.989	群体1
17.35_408.7827 m/z	反式九氯	408.7827	17.35	0.14	1	4.86E-01	5.03E-01	1.757	群体5
17.77_245.9996 m/z	o,p'-DDE	245.9996	17.77	0.13	1	4.84E-01	5.01E-01	2.183	群体5
17.77_317.9344 m/z	p,p'-DDE	317.9344	17.77	0.15	1	4.75E-01	4.92E-01	2.313	群体5
18.19_359.8417 m/z	PCB 138	359.8417	18.19	0.03	2	3.52E-04	7.81E-04	无穷大	群体1
18.56_325.8790 m/z	PCB 118	325.8790	18.56	0.09	2	2.50E-05	7.53E-05	2.602	群体1
18.74_408.7820 m/z	顺式九氯	408.7820	18.74	0.07	1	2.10E-02	3.10E-02	2.212	群体1
19.07_359.8402 m/z	PCB 153	359.8402	19.07	0.19	2	7.34E-07	3.25E-06	2.103	群体5
19.58_235.0070 m/z	p,p'-DDT	235.0070	19.58	0.05	2	7.00E-02	8.90E-02	2.172	群体1
19.61_359.8400 m/z	PCB 141	359.8400	19.61	0.2	3	4.07E-05	1.16E-04	1.869	群体1
19.93_393.8011 m/z	PCB 187	393.8011	19.93	0.08	2	7.96E-04	2.00E-03	2.05	群体1
20.79_393.8006 m/z	PCB 180	393.8006	20.79	0.07	4	4.15E-06	1.52E-05	2.875	群体1
20.85_288.0929 m/z	苯并菲	288.0929	20.85	0.23	2	0.216	0.244	4.615	群体1
21.07_393.8009 m/z	PCB 180	393.8009	21.07	0.11	2	2.61E-04	6.00E-04	1.888	群体5
21.66_393.8006 m/z	PCB 170	393.8006	21.66	0.07	3	2.78E-04	6.34E-04	3.191	群体1
23.21_563.6204 m/z	PBDE 99	563.6204	23.21	0.12	2	4.34E-06	1.58E-05	3.859	群体1
26.97_276.0931 m/z	苯并[ghi]芘	276.0931	26.97	0.15	1	8.70E-02	1.07E-01	30.756	群体1
27.49_276.0926 m/z	苯并[ghi]芘	276.0926	27.49	0.19	1	3.66E-01	3.98E-01	6.746	群体1

表1.手动创建数据库中的24种POPs鉴定结果，展示了丰度最高的群体。

群体5中，p,p'-DDT、p,p'-DDE和o,p'-DDE略有上调；然而，根据p值发现不同群体之间的化合物浓度无显著差异。二氯联苯二氯乙烯(DDE)由二氯二苯三氯乙烷(DDT)的脱卤化氢作用生成。由于在农业中DDT曾经作为杀虫剂广泛使用，并且具有脂溶性和生物累积性，因此在动物组织中经常被检测到。它也经常在鱼类中被检出，这些鱼类是这些小型群体的主要饮食来源²。DDT和DDE属于内分泌干扰物，并被认为是潜在的人类致癌物质。DDE和DDT可在几个人群中提供相关的POPs暴露标志物，因此必须进行鉴定。本文重点介绍的靶向方法可以实现这一鉴定。

随后对鉴定出的化合物列表进行筛选，仅显示最大倍数变化大于2的化合物，从而突出显示不同群体之间存在显著差异的化合物。表2中展示了筛选所得的11种化合物。群体1中PCB 118的上调结果如图3所示。群体1中这些目标化合物的丰度最高，因此决定对此群体进行进一步的非靶向分析。

化合物	化合物鉴定	加合物	m/z	保留时间	得分	碎片离子得分	质量误差 (ppm)	Anova (p)	q值	最大倍数变化
12.26_283.8095 m/z	六氯苯	MDot+	283.8095	12.26	29.10	0.0	-0.8	6.39E-07	2.89E-06	2.502
13.35_178.0775 m/z	葱	MDot+	178.0775	13.35	35.60	0.0	0.2	7.49E-05	1.99E-04	2.087
16.67_202.0774 m/z	蒽葱	MDot+	202.0774	16.67	30.70	0.0	-0.7	3.00E-03	6.00E-03	2.073
18.19_359.8417 m/z	PCB 138	MDot+	359.8417	18.19	24.50	0.0	2.1	3.52E-04	7.81E-04	无穷大
18.56_325.8790 m/z	PCB 118	MDot+	325.8790	18.56	46.00	65.1	-2.8	2.50E-05	7.53E-05	2.602
18.74_408.7820 m/z	顺式九氯	MDot+	408.7820	18.74	36.20	0.0	-3.8	2.10E-02	3.10E-02	2.212
19.07_359.8402 m/z	PCB 153	MDot+	359.8402	19.07	40.90	30.2	-2.3	7.34E-07	3.25E-06	2.103
19.93_393.8011 m/z	PCB 187	MDot+	393.8011	19.93	45.20	37.3	-2.3	7.96E-04	2.00E-03	2.05
20.79_393.8006 m/z	PCB 180	MDot+	393.8006	20.79	28.40	37.4	-3.6	4.15E-06	1.52E-05	2.875
21.07_393.8009 m/z	PCB 180	MDot+	393.8009	21.07	29.60	39.5	-3.7	2.61E-04	6.00E-04	1.888
23.21_563.6204 m/z	PBDE 99	MDot+	563.6204	23.21	44.80	91.4	-1.2	4.34E-06	1.58E-05	3.859

表2.最大倍数变化大于2的已鉴定化合物列表。

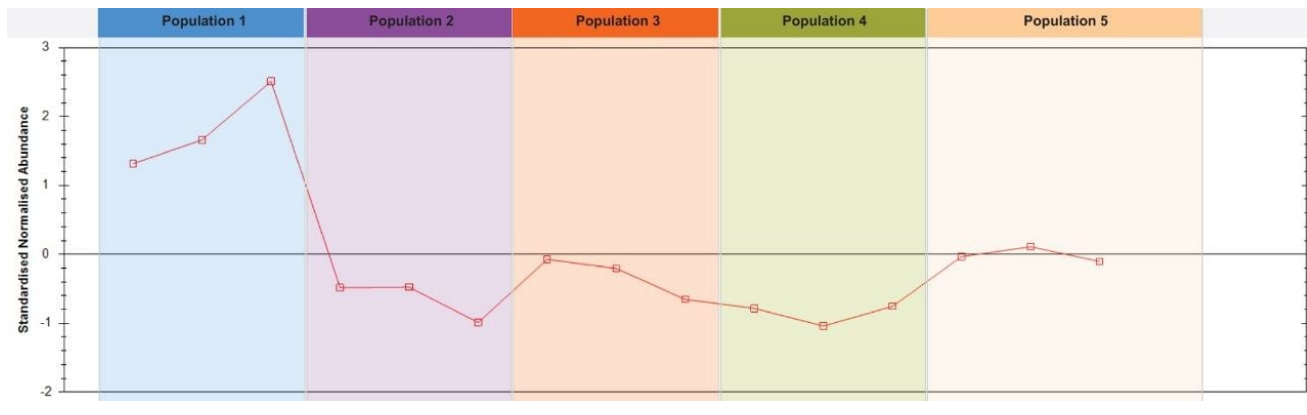


图3.检测到群体1中的PCB 118表达上调。

非靶向分析

为进一步研究数据，我们移除了所有筛选条件。Progenesis Q1软件自动生成了主成份分析(PCA)图，清晰地描述了各群体的分离结果（图5）。为了进行更深入的统计检验，数据被自动导出到Ezinfo。使用正交偏最小二乘法(OPLS-DA)模型将群体1与所有其他群体进行比较。这样可以生成S-plot，可以鉴定S-plot极值处的重要目标化合物。图5展示了OPLS-DA模型生成的S-plot。选择17个重要标志物直接导入Progenesis Q1。

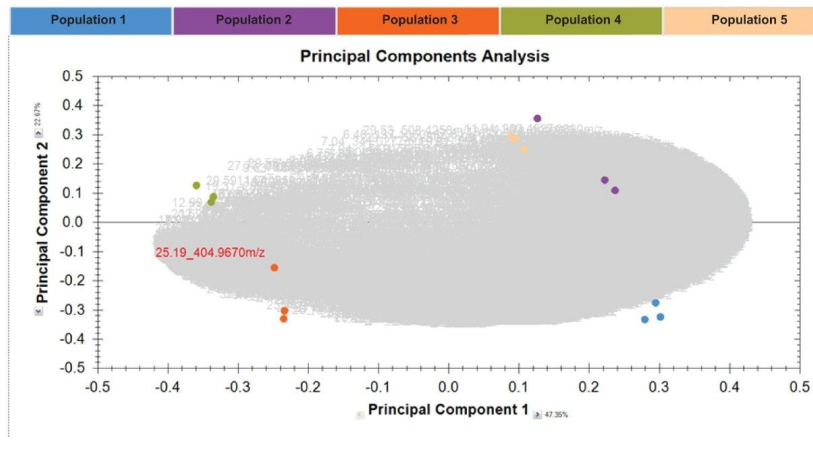


图4.主成份分析(PCA)图，显示了每个群体三个重复样的分离结果。

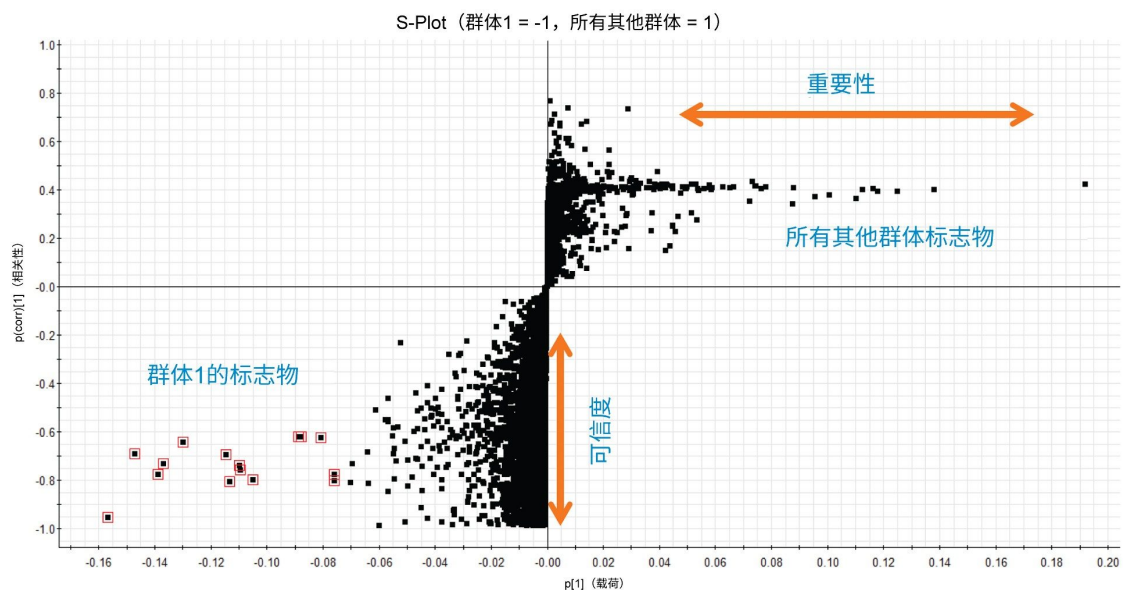


图5.S-plot，显示群体1中的重要目标标志物。

随后在数据库中搜索目标化合物。在搜索过程中，根据所选的ChemSpider数据库搜索了母离子精确质量数，质量误差不超过5 ppm。然后对ChemSpider搜索得到的可能化合物的结构进行了计算机模拟碎裂，并与实验中该化合物高能谱图中的碎片离子峰进行比较，所得质量误差在10 ppm以内。这些结果随后根据精确质量数匹配得分和

碎片离子得分进行了排序。该过程自动完成，用时不到1分钟。搜索参数请参见图6。

ChemSpider数据库搜索得到了许多有趣的结果，首先是生育酚，它得到了良好的碎片匹配，其中37%的碎片可与高能谱图中的对应。生育酚(TCP)是一类有机化合物，其中许多化合物具有维生素E活性。蔬菜和浆果中含有大量TCP³。这些偏远群体主要以素食为主，这可以解释该人群中TCP浓度较高的原因。数据库搜索的结果显示在图7中。

ChemSpider search parameters
Define a set of ChemSpider parameters that can be saved for later reuse. Learn more in the [online reference](#).

Name:
Search

Required search parameters

Precursor tolerance: 5 ppm

Data sources: [1] KEGG, [2] NIST, [3] Human Metabolome Database, [4] Pesticide Common Names, [5] ChemSpiderman.
Select data sources...

Optional search parameters

Perform theoretical fragmentation

Fragment tolerance: 10 ppm

Filter by isotope similarity score

Isotope similarity: 95 %

Filter by elemental composition

Elemental composition: H: 0-500 C: 0-200 N: 0-10 O: 0-30
P: 0-2 S: 0-1 Cl: 0-10 Br: 0-10
Select elemental composition...

Save Cancel

图6. ChemSpider数据库搜索参数。

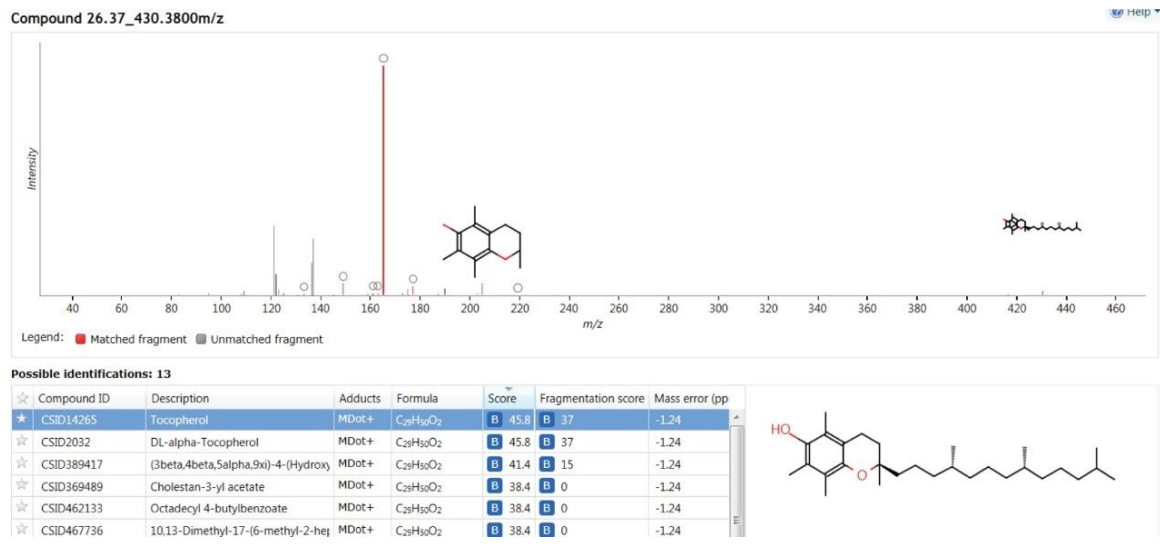


图7.数据库搜索结果中可能鉴定出的生育酚。

通过数据库搜索准确鉴定出的另一个物质是1,3-苯并噻唑。苯并噻唑(BTH)是一类可以大量生产的化合物。它们被用作缓蚀剂，可见于橡胶材料、除草剂、偶氮染料和食品调味剂中⁴。这一发现意义重大，因为这些偏远群体不会直接使用含有BTH的材料；因此可以得出结论，该暴露是由环境污染引起的。另一个假设是，群体1是唯一通过南部直达机场获得现代食品供应的群体。BTH的存在可能是加工食品消费的生物指标，因为BTH被广泛用作包装中的保鲜剂。这两种理论都可以进一步研究，来验证BTH暴露的来源。图8展示了可能的1,3-苯并噻唑鉴定结果。

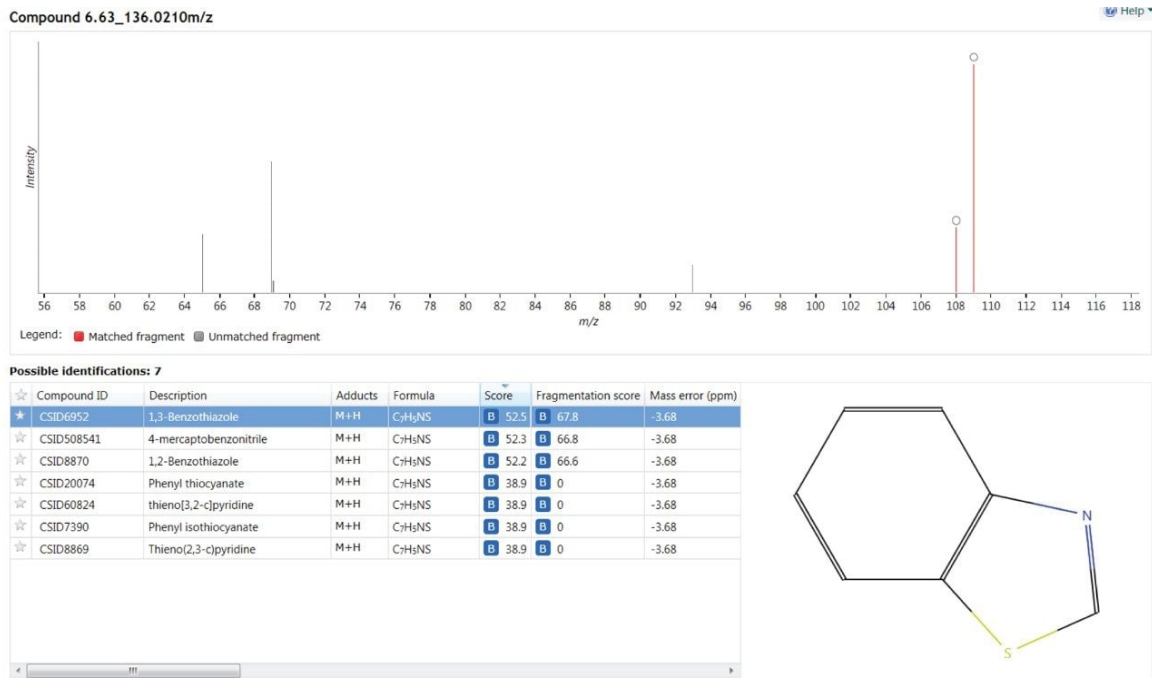


图8.1,3-苯并噻唑数据库搜索结果的可能鉴定结果。

BTH是一组化合物，使用Progenesis Q1进行了相关性分析。软件自动生成了展示相关化合物的树状图。从树状图中选出的几种化合物与1,3-苯并噻唑相关。图9展现了这些化合物关系的软件可视化图。这些化合物被标记并在ChemSpider数据库中进行了搜索。由此鉴定出另一种可能的噻唑化合物，即4-苯基-2-丙基-1,3-噻唑（图10）。

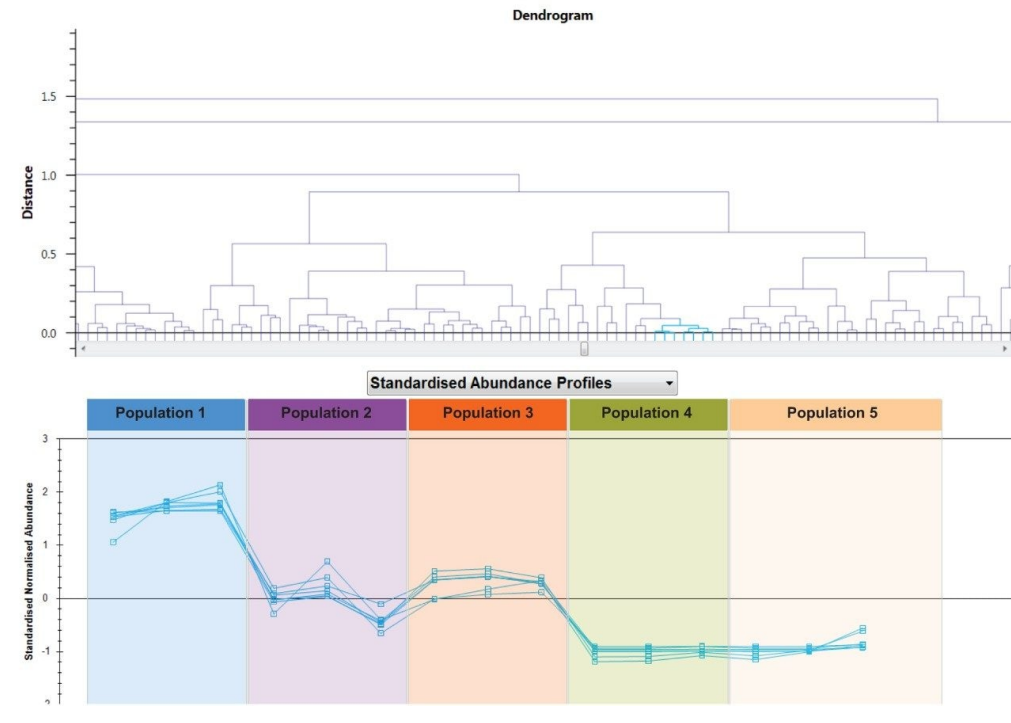


图9.展示化合物之间关系的树状图。

Find a compound: **Filter is active**

Compound	Highest mean	m/z	Retention time	Peak Width	Tag	Accepted ID	z	Anova (p)	Identifications	q Value	Max fold cl
6.64_204.0837m/z	Population 1	204.0837	6.64	0.24			1	4.36E-06	4	1.59E-05	Infinity
6.64_232.1151m/z	Population 1	232.1151	6.64	0.67			1	2.64E-05	5	7.89E-05	Infinity
3.73_993.2731m/z	Population 1	993.2731	3.73	0.12			1	3.08E-05	0	9.05E-05	205
6.64_246.1305m/z	Population 1	246.1305	6.64	0.64			1	6.12E-05	4	0.000166	2.03E+03
6.63_136.0210m/z	Population 1	136.0210	6.63	0.83			1	8.67E-05	7	0.000226	38.8
6.64_303.2009m/z	Population 1	303.2009	6.64	0.79			1	0.000136	1	0.000338	57.3
6.63_274.1616m/z	Population 1	274.1616	6.63	0.70			1	0.000297	1	0.000673	1.18E+03

Compound 6.64_204.0837m/z:

Compound abundance Possible identifications 3D Montage

Possible identifications: 4

Compound ID	Description	Adducts	Formula	Retention time	Score	Fragmentation score
☆ CSID521868	4-Phenyl-2-propyl-1,3-thiazole	M+H	C ₁₂ H ₁₃ NS		B 37.2	B 0
☆ CSID525772	2-Isopropyl-4-phenyl-1,3-thiazole	M+H	C ₁₂ H ₁₃ NS		B 37.2	B 0
☆ CSID529402	5-Isopropyl-2-phenyl-1,3-thiazole	M+H	C ₁₂ H ₁₃ NS		B 37.2	B 0
☆ CSID529418	2-Mesityl-1,3-thiazole	M+H	C ₁₂ H ₁₃ NS		B 37.2	B 0

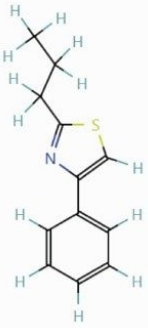


图10.数据库搜索结果中可能鉴定出的4-苯基-2-丙基-1,3-噻唑。

结果确认

为确认样品中该化合物的碎片离子谱图和鉴定结果，我们获取了1,3-苯并噻唑(BTH)标准品。本次分析采用了不同的GC方法，分析日期晚于初始分析。标准品谱图与ChemSpider搜索中建议的BTH鉴定结果以及样品谱图相匹配。这样就可以更新初始数据库，将BTH作为目标暴露化合物纳入其中，进行进一步的群体研究。

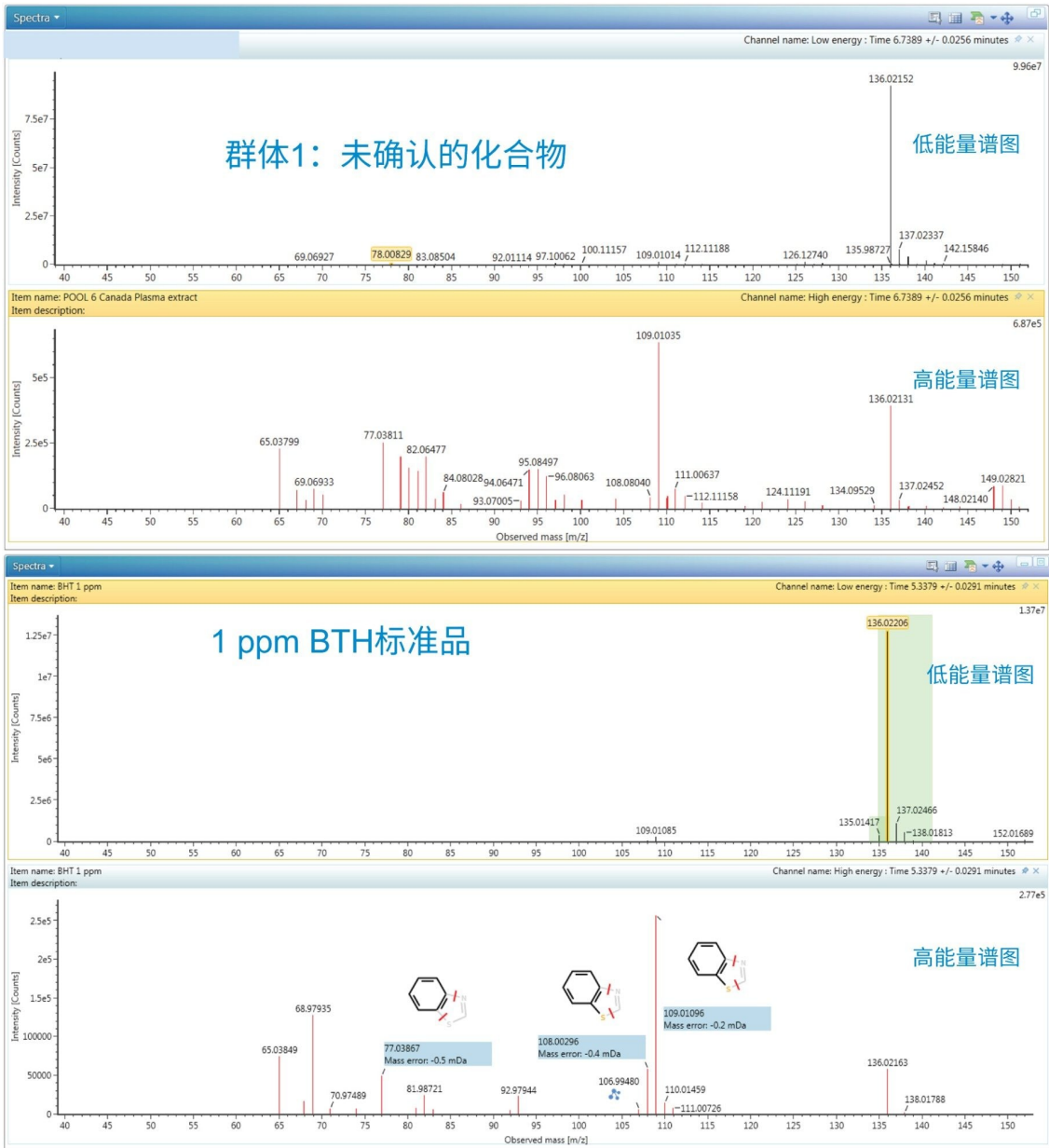


图11.将群体1中未知化合物与1 ppm BTH标准品的谱图进行比较。

结论

暴露研究涉及复杂的数据以及数据集内的细微比较。利用APGC软电离技术，并在一种方法中采集母离子和碎片离子的精确质量数数据，可以生成完整的数据集。结合Progenesis QI软件的处理能力，可以快速轻松地执行复杂的统计分析。Progenesis QI还支持搜索数千个在线数据库和用户生成的数据库。这种硬件与软件的组合为暴露组学工作流程提供了一种简化的方法。

参考资料

1. 大气压气相色谱(APGC). 沃特世白皮书, P/N 720004771EN. August, 2013.
2. G E Burdick, E J Harris, H J Dean, T M Walker, J Skea, D Colby. The Accumulation of DDT in Lake Trout and the Effect on Reproduction. *Transactions of the American Fisheries Society*.93:2, 1964.
3. Piironen et al. Tocopherols and Tocotrienols in Finnish Foods: Vegetables, Fruits, and Berries. *J Agric Food Chem*.3086, 34 I: 742–746.
4. Asimakopoulos et al. Benzotriazoles and benzothiazoles in human urine from several countries: A perspective on occurrence, biotransformation and human exposure. *Env Intl*. Volume 59, September, 2013.

特色产品

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

大气压气相色谱(APGC) <<https://www.waters.com/10100362>>

Progenesis QI <<https://www.waters.com/134790652>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720006172ZH, 2018年1月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)