

## 一种使用LC-QToF对消费后再生塑料中的萃取物进行可靠表征的新策略

---

Hania Khoury-Hollins

Waters Corporation

---

### 摘要

塑料无处不在，现代生活的方方面面都有它的身影。塑料回收是保护自然资源和减少环境足迹的一种方式。成功回收意味着再生塑料应具有与原生塑料相似的特性，此外还需要符合不同的消费者安全要求。在本研究中，我们通过一个液相色谱与高分辨率飞行时间质谱联用的发现工作流程，来分析消费后再生塑料(PCR)低密度聚乙烯(LDPE)。我们在不同LDPE再生批次的各种LDPE样品中鉴定出关键标志化合物。

### 优势

- 区分不同质量的消费后再生材料(PCR)
- 利用Xevo™ G3 QToF技术强大的高分辨率精确质量测量功能，可靠地鉴定与再生PCR的质量和物理特性相关的化合物
- 用于调查PCR产品安全性使其在经济局势中重焕生机的工具
- 一种使用Xevo G3 QToF、MassLynx™以及Progenesis™ QI的集成、简化的仪器和软件解决方案

### 简介

---

大多数塑料都是由化石燃料生产而成的[<https://www.ciel.org/issue/fossil-fuels-plastic/>]<sup>1</sup>。塑料已成为现代生活中不可或缺的一员，可以用于医疗器械、家用工具、包装等方面。因此构成了家庭垃圾的很大一部分。化石燃料衍生的塑料所具有的特性导致其在使用后数十年甚至数百年都能够保持完整。因此，几十年来大量使用短寿命的一次性塑料给全球环境带来了灾难<sup>2</sup> [UN plastic general assembly <https://www.un.org/pga/73/plastics/>]。

为了保护自然资源并减少塑料生产和垃圾对环境的影响，我们需要将塑料垃圾视为一种宝贵的资源。通过回收利用，可以减少塑料生产对化石燃料的依赖，并通过尽可能长时间地循环使用来解决塑料垃圾问题。

为使消费后再生塑料(PCR)成功重焕生机，需要鉴定其中可能影响性能并危及消费者安全的杂质。塑料在其生命周期中带来的高水平污染可能会限制其预期用途。因此，调查PCR产品的质量不仅是为了研究其物理特性，也是为了鉴定和定量任何可能威胁用户安全的有害化学成分，这对回收行业造成了沉重的负担。安全标准的严格程度取决于潜在的最终用途。例如，与使用再生塑料制成的户外家具相比，食品包装材料(FCM)对邻苯二甲酸酯、双酚和矿物油碳氢化合物等化学品的容忍阈值非常低。因此，需要一个灵活的工作流程，允许在不同批次的PCR中检测和鉴定杂质。

发现工作流程是一种重要的无偏分析方法，常用于表征不同条件之间的变化。它在系统生物学研究中应用广泛，最近被应用于鉴定来自塑料食品包装材料的迁移物[Martinez-Bueno *et al.* 2019]<sup>3</sup>。通常使用液相色谱(LC)或气相色谱(GC)与高分辨率质谱(HRMS)联用进行分析。

在本应用纪要中，我们采用了一种新策略来分析不同批次的再生LDPE (rLDPE)。将ACQUITY™ Premier LC与Xevo G3 QToF联用，分析了不同批次rLDPE中的非挥发性迁移化合物。然后使用Progenesis QI™软件直接处理数据。观察到不同rLDPE质量之间存在差异，并使用食品接触化学品数据库(FCCdb) [Groh *et al.* 2021]和塑料包装化学品数据库(CPPdb) [Groh *et al.* 2019]标注了差异表达的化合物<sup>4-5</sup>。使用市售化学品标准品鉴定和确认标注的化合物。

---

## 实验

### 样品前处理

一家再生材料的工业提供商提供了四组样品：原生LDPE (vLDPE)、含添加剂的原生LDPE (vLDPE+)、劣质再生LDPE (劣质rLDPE) 和优质再生LDPE (优质rLDPE)。各组提取物的制备方法如下：取15 g颗粒或2.5 g绒毛浸入100 mL甲醇中。在磁力搅拌下于40 °C提取1小时。容器保持密闭以免溶剂蒸发。然后收集甲醇并用0.45微米PVDF过滤器过滤。

在从原生塑料颗粒和不同质量的rLDPE中制备提取物后，通过混合100  $\mu$ L各提取物制备质控品(QC)。然后依次使用反相色谱法和高分辨率质谱法分析样品和QC。每个样品进样两次。进样顺序随机，QC在五次样品进样之间以及序列的开始和结束时进样。

## LC-MS条件

液相色谱系统:	Waters™ ACQUITY Premier液相色谱系统
样品瓶:	LC-MS认证透明玻璃样品瓶(P/N: 600000671CV)
色谱柱:	CORTECS™ C <sub>18</sub> , 1.6 $\mu$ m, 2.1 x 100 mm, 90 Å色谱柱(P/N: 186007095)
柱温:	50°C
样品温度:	6°C
进样体积:	5 $\mu$ L
流速:	0.3 mL/min
流动相A:	H <sub>2</sub> O + 0.1%乙酸(v/v)
流动相B:	100%甲醇

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.3	98	2	初始
0.5	0.3	98	2	6
8.5	0.3	2	98	6
13.5	0.3	2	98	6
13.5	0.3	98	2	1
16	0.3	98	2	1

## 质谱条件

质谱系统:

Xevo G3 QTof

离子源条件:

脱溶剂气温度: 600°C

脱溶剂气流速(L/h): 600

离子源温度: 150°C

锥孔气流速(L/h): 150

源补偿电压: 80

采样锥孔电压: 30

毛细管电压:

1 kV

电离模式:

ESI +/-

质量范围：	$m/z$ 50–1200
采集速率：	每秒5幅谱图(Hz)
实时校正标准液：	亮氨酸脑啡肽 ( $m/z$ 556.276和 $m/z$ 554.262，分别用于正离子模式和负离子模式)。采集到实时校正标准液质谱图
采集模式：	High Definition MS <sup>E</sup> (HDMS <sup>E</sup> )，一种数据非依赖型采集方法
碰撞能量：	低碰撞能量：0 高碰撞能量：梯度（正离子模式和负离子模式分别为20~40 eV/20~50 eV）。

## 软件工具

使用MassLynx™ v4.2进行数据采集，使用Progenesis™ QI 3.0.7929.47290进行统计分析

---

## 结果与讨论

发现工作流程在系统生物学中有详细描述。我们应用了类似的方法来表征不同的消费后再生塑料(PCR) [Broadhurst *et al.*, 2018]<sup>6</sup>。简单来讲，就是利用LC-MS分析样品和QC，得到的原始数据随后通过Progenesis QI处理。通过对检测到的离子进行去卷积并将存在的加合物分组为一种化合物来进行峰提取。对于正离子模式，将质子化和钠化分子离子归为一种化合物。对于负离子模式，将去质子化和乙酸盐加合物归为一种化合物。完成质量数和保留时间对齐步骤之后，对所有化合物的数据进行了归一化。

在33次进样中，分别在正离子模式和负离子模式下检测到13816种和7955种化合物。通过进行多变量分析，我们得以去除噪音并将列表范围缩小到 $p$ 值 $\leq 0.05$ 的化合物（图1）。

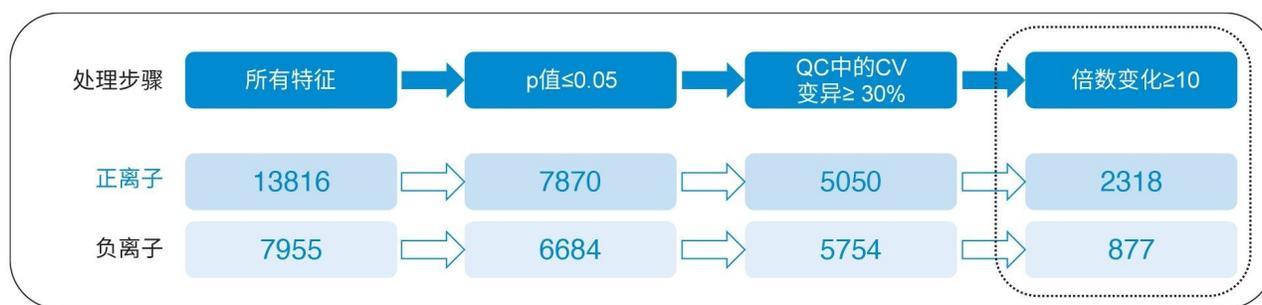


图1.数据处理步骤汇总，以及在正负离子模式下产生的化合物数量。数据分析是使用Progenesis Q1进行的。

为进一步缩小潜在化合物的范围，我们排除了质控品进样(QC)中变异系数(CV)  $\geq 30\%$ 的任何检测到的化合物。因此，正负离子模式下的化合物列表分别减少到5050和5754（图1）。最后，我们只保留了与原生颗粒提取物相比变化超过10倍(FC)的化合物列表[Martinez-Bueno *et al.*2019]<sup>3</sup>。随后将得到的最终化合物列表用于所有以下统计分析。

为了研究分析样品之间的关系，我们执行了主成分分析(PCA)，这是一种帮助可视化样品之间关系的非参数方法（图2）。

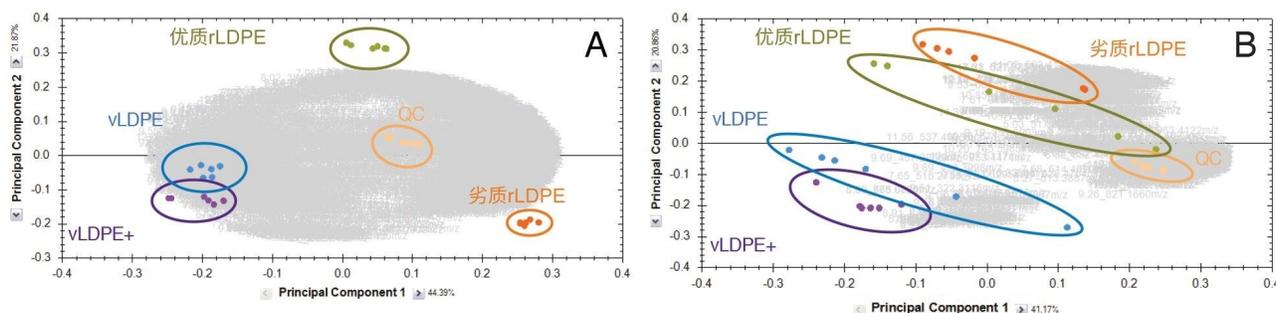


图2.正离子模式(A)和负离子模式(B)化合物的主成分分析(PCA)

图2描绘了捕获数据中最大变异的第一个和第二个PCA成分的散点图。成分1和成分2的数据在正离子模式下分别为44.39%和21.87%，在负离子模式下分别为41.17%和20.86%。

在正离子模式和负离子模式下（图2A和2B），QC进样都形成一个紧密的群组。因此，任何观察到的样品群组都可以解释为样品之间的相似性，而非随机事件。

在两种电离模式下，原生颗粒(vLDPE)和含添加剂的原生颗粒(vLDPE+)都形成两个类似的组（图2A和2B）。事实上，这两种样品非常相似，只是后者有少量添加剂。在正离子模式下，这些添加剂使两组样品有细微区别（图2A）。不过，vLDPE和vLDPE+在正负电离模式下都无法明显区分。而另一方面，vLDPE（含或不含添加剂）与优质和劣质rLDPE之间存在明显区别（图2A和2B）。在正电离模式下，各亚组之间的区别更为突出，劣质rLDPE提取物很容易与优质rLDPE提取物区分（图2A）。负离子模式下的数据则较为分散，无法明显区分劣质和优质rLDPE。因此，在正离子模式下检测到的化合物对于将两组rLDPE提取物彼此分离以及与原生颗粒分离更为关键。

为鉴定各组中的重要标志化合物，我们对正离子模式下检测到的2318种化合物进行了相关性分析。相关性分析可以指出具有相似丰度趋势的不同化合物组。图3的树状图说明了在正离子模式下检测到的不同化合物。树状图中的每个分支各对应一组具有相似丰度趋势的化合物（图3，上图）。y轴对应各分支之间的距离。距离值越小，化合物之间的相关性越强。图中显示阈值为1。箭头指向两个距离值小于0.85的强相关性化合物分支。这两个化合物分支的丰度曲线相似（图3下图）。这些化合物是劣质rLDPE中特有或丰度较高的物质。由于制备QC样品时的稀释系数，这些化合物也在QC样品中以较低丰度检出。

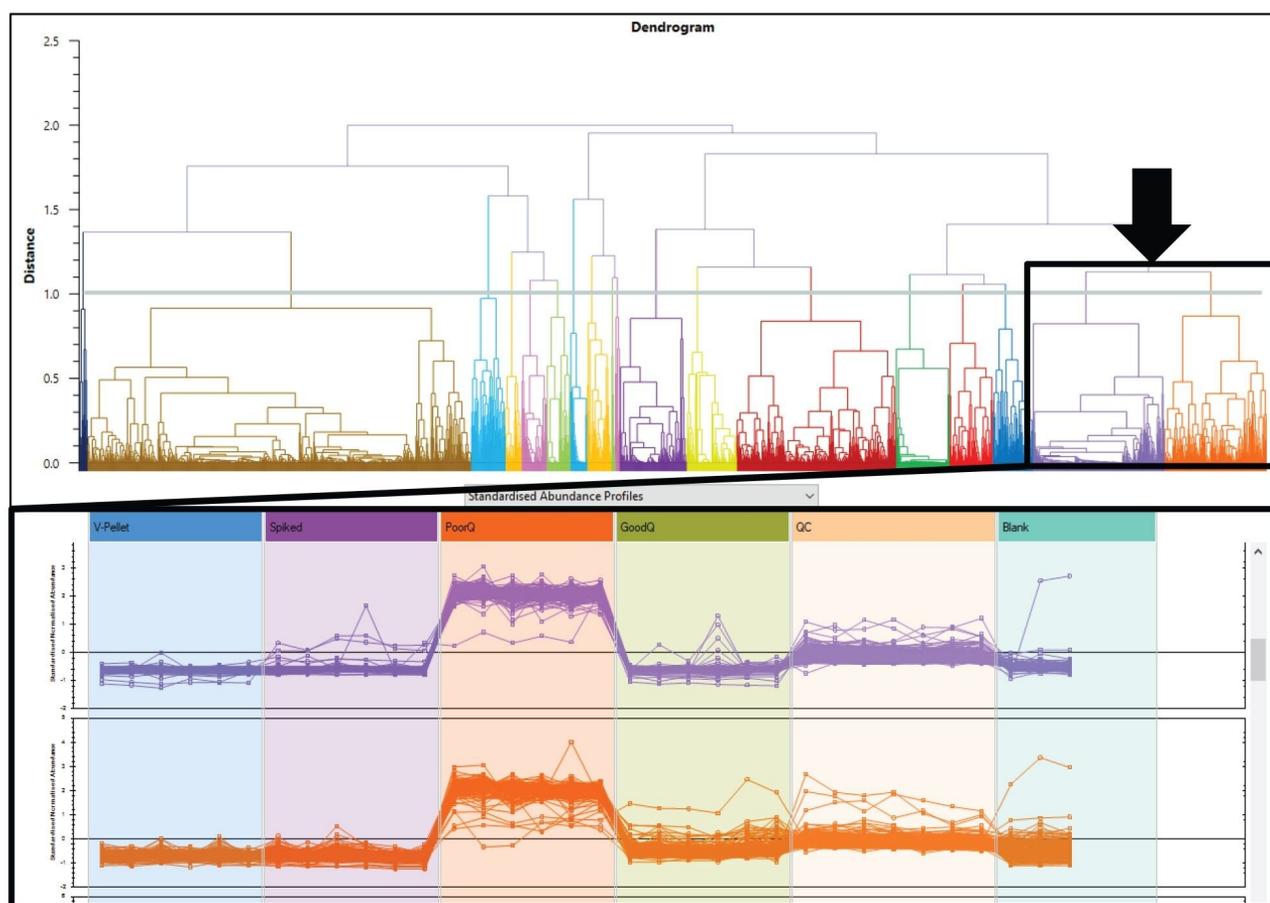


图3.正电离模式下检测到的化合物之间的相关性分析。上图对应于阈值距离选为1.0的树状图。下图说明了不同样品进样中同一分支内化合物的丰度。每组样品由不同颜色的列区分。从左到右：蓝色：*vLDPE*，紫色：含添加剂的*vLDPE*，橙色：劣质*rLDPE*，绿色：优质*rLDPE*，浅橙色：质控品，蓝绿色：空白样品。

将优质和劣质*rLDPE*提取物与*vLDPE*进行比较，与*vLDPE*相比，劣质*rLDPE*提取物中有457种化合物的含量至少高出10倍。此外，优质和劣质*rLDPE*提取物中有814种化合物的丰度显著不同。

Progenesis能够快速验证所有标注化合物的峰提取过程。图4显示了在9.89分钟处检测到的 $m/z$  441.2978示例。该离子属于 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 化合物群组。 $m/z$  441.2978对应于 $[M+Na]^+$ （图4）。

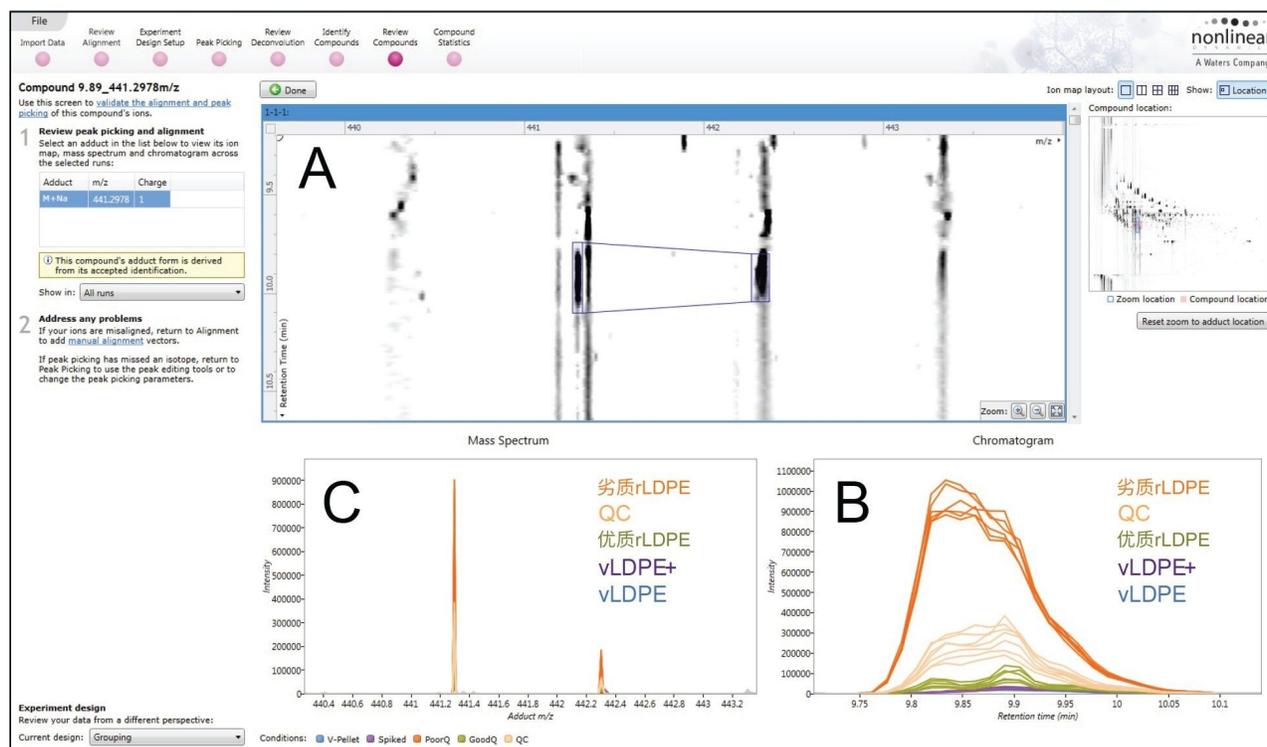


图4.使用Progenesis Q1进行峰提取。图4A为 $m/z$ 与保留时间的热图。蓝线代表离子簇，包含单同位素质量数和第一同位素质量数。图4B为24次进样中 $m/z$  441.2978的提取离子流色谱图(EIC)叠加图。图4C为24次进样的质谱图叠加图。每种颜色代表一组样品。劣质rLDPE样品（深橙色迹线）丰度最高，其次是质控品（浅橙色迹线）和优质rLDPE提取物（绿色迹线）。

图4所示为在Progenesis Q1中查看化合物的结果。上图为 $m/z$ 与保留时间的热图（图4A），蓝色方框圈出了目标化合物的离子簇。右下图（图4B）为4组样品24次进样的提取离子流色谱图(EIC)。我们可以观察到不同进样之间的重现性以及各组样品之间的丰度差异。劣质rLDPE提取物样品（深橙色迹线）丰度最高，其次是质控品（浅橙色迹线）和优质rLDPE提取物（绿色迹线）。不含或含添加剂（蓝色和紫色迹线）的原生颗粒在 $m/z$  441.2978的丰度极低或没有。左下图为24次进样的质谱图叠加图（图4C）。由此可以认为该分子离子的峰提取和保留时间对齐是正确的。

为鉴定这些特征化合物，我们使用了两个相关数据库：食品接触化学品数据库（FCCdb，3237个条目）和塑料包装化学品数据库（CPPdb，7149个条目）[分别参考Groh *et al.*2021和Groh *et al.*2019]<sup>4-5</sup>。这些数据库共有2353种化合物。化合物注释基于精确质量信息、同位素相似性和存在的碎片离子信息。对于数据库中没有实验性碎片离子谱图的化合物，Progenesis Q1会根据化学结构进行理论碎裂，并与MS<sup>E</sup>实验测得的碎片进行比较。化合

物注释的可接受标准为：母离子精确质量数的偏差在± 10 ppm以内，碎片离子的偏差在± 20 ppm以内。当目标化合物与相应的纯化学品标准品具有相同的保留时间和碎片离子谱图时，则视为可靠的化合物鉴定[Schymanski *et al.*2015]<sup>7</sup>。

在劣质rLDPE提取物的457种高丰度化合物中共标注了33种化合物，在优质和劣质rLDPE提取物的814种差异表达化合物中共标注了57种化合物。其中匹配度靠前的是各种邻苯二甲酸酯，例如：邻苯二甲酸二壬酯/邻苯二甲酸二异壬酯，或邻苯二甲酸辛癸酯、邻苯二甲酸二(2-丙基庚)酯、邻苯二甲酸二癸酯/邻苯二甲酸二异癸酯、邻苯二甲酸二正辛酯和单硬脂酸甘油酯。

图5显示了根据精确质量数和碎片离子（由MS<sup>E</sup>生成并与理论碎片进行比较）在9.89分钟处检测到的 $m/z$  441.2978的注释示例。

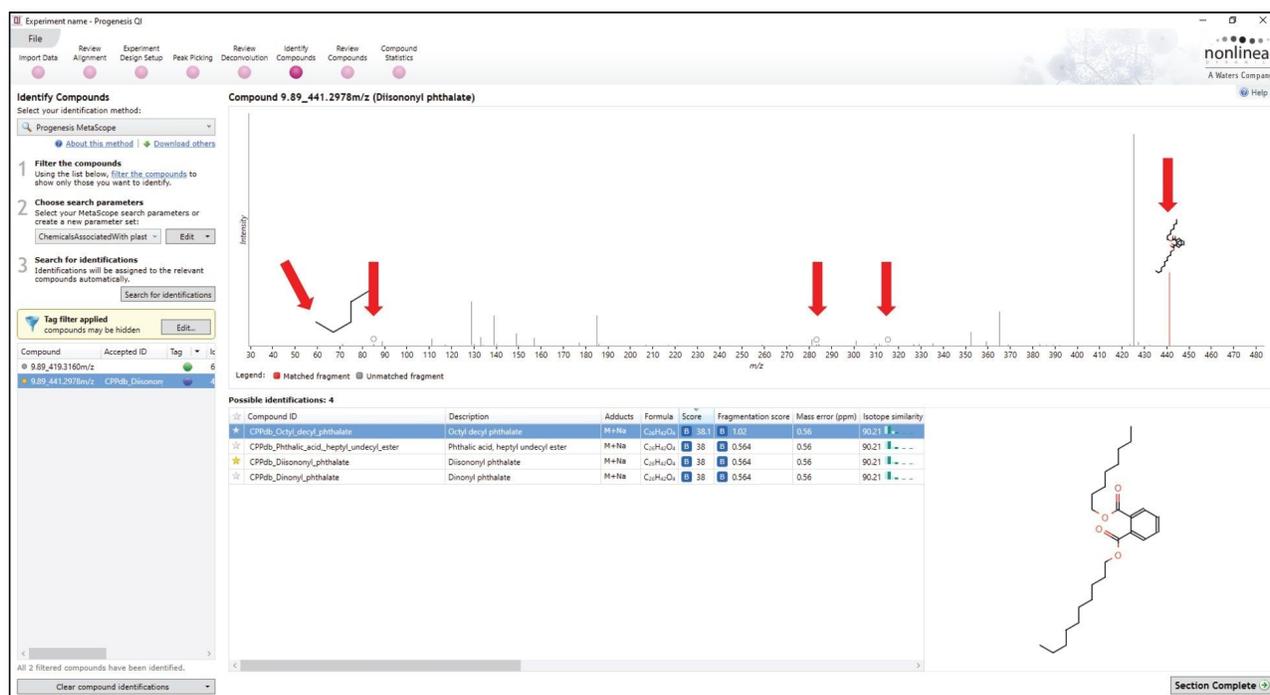


图5.在9.89分钟处检测到 $m/z$  441.2978的注释。潜在化合物列表包含使用CPPdb注释的四种异构体。通过与Progenesis Q1执行的理论碎裂比较来标注实验得到的碎片。

$m/z$  441.2978对应于C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>的钠加合物，质量精度为± 0.56 ppm。该化合物可能是推测的四种异构体中的任何一种。通过与模拟碎片离子谱图比较标注由MS<sup>E</sup>获得的碎片，在图5中用红色箭头突出显示。这些碎片是四种建议

的邻苯二甲酸酯异构体之间所共有的。邻苯二甲酸辛癸酯的碎片匹配得分最高(图5)。还可以观察到其他高丰度碎片。值得注意的是, MS<sup>E</sup>实验生成了其他共洗脱化合物的碎片。这些高丰度碎片很可能与 $m/z$  441.2978无关, 而是对应于与该化合物的 $[M+H]^+$ 离子共洗脱的化合物。所标注碎片的低丰度可能是由于稳定的 $[M+Na]^+$ 难以碎裂。事实上, 众所周知, 碎裂 $[M+Na]^+$ 分子离子需要更高的碰撞能量。

通过比较化学品标准品和样品的保留时间和碎片离子谱图获得了1级鉴定[Schymanski *et al* 2015].<sup>7</sup>。为了揭示 $m/z$  441.2978的真实身份, 我们先后使用相同的色谱法和靶向MS/MS实验分析了邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)和LDPE样品的纯化学品标准品。

$m/z$  441.2978的靶向MS/MS实验中的四极杆分离机制能够消除其他共洗脱离子并碎裂分离的目标离子( $\pm 1$  Da)。此MS/MS实验能够比较样品和纯标准品进样中 $m/z$  441.2978质量数的碎片离子谱图数据。

DINP在9.8分钟检出,  $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 分别为 $m/z$  419.3161和 $m/z$  441.2981。图6对应于不同样品和1  $\mu\text{g/mL}$  DINP进样中的EIC  $m/z$  441.298。

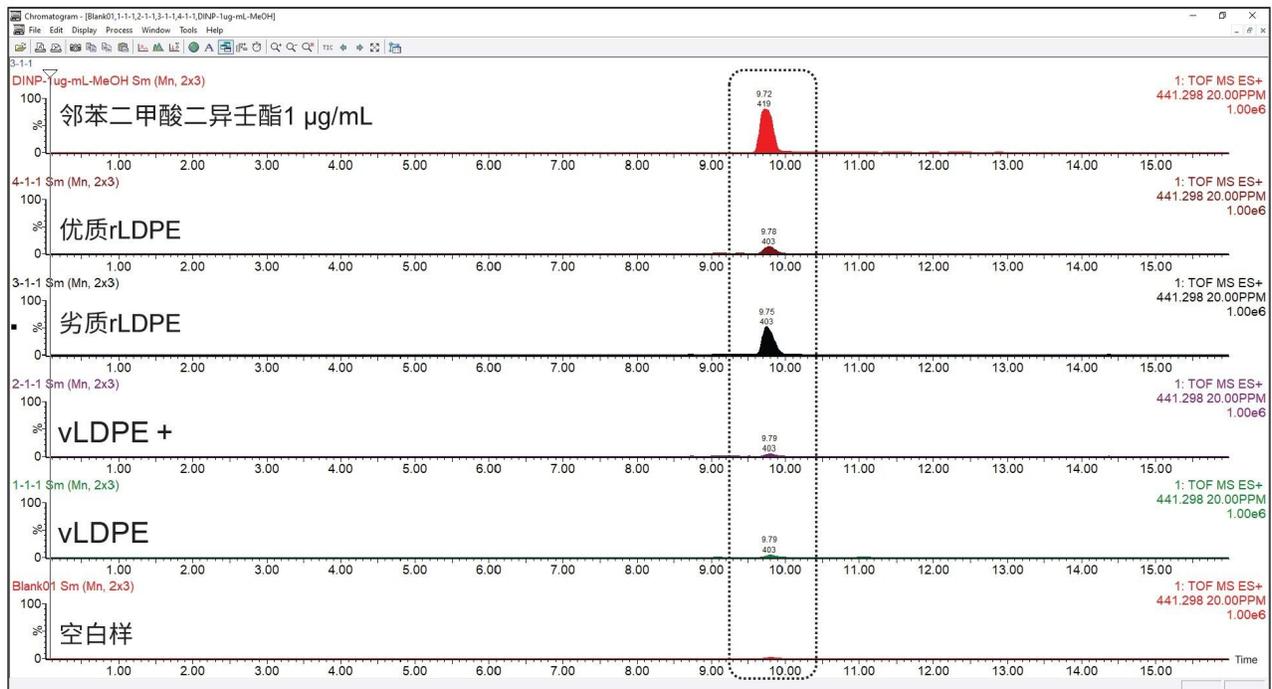


图6. 样品和邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)标准品中 $m/z$  441.298的提取离子流色谱图(EIC)。从下到上的EIC依次为: 空白样品、原生LDPE提取物(vLDPE)、含添加剂的原生LDPE提取物(vLDPE+)、劣质rLDPE、优质rLDPE和1  $\mu\text{g/mL}$  邻苯二甲酸二异壬酯标准品(DINP)。

如前所述， $m/z$  441.298主要在劣质rLDPE提取物中检出，在优质rLDPE提取物中有少量，在vLDPE提取物（含或不添加剂）中仅为痕量水平。DINP的保留时间与不同样品中的 $m/z$  441.298相同（图6）。为成功碎裂钠加合物，使用了更高的碰撞能量(25–90 eV)。尽管如此，碰撞能量高达90 eV时， $m/z$  441.2956仍然是丰度最高的峰（图7）。

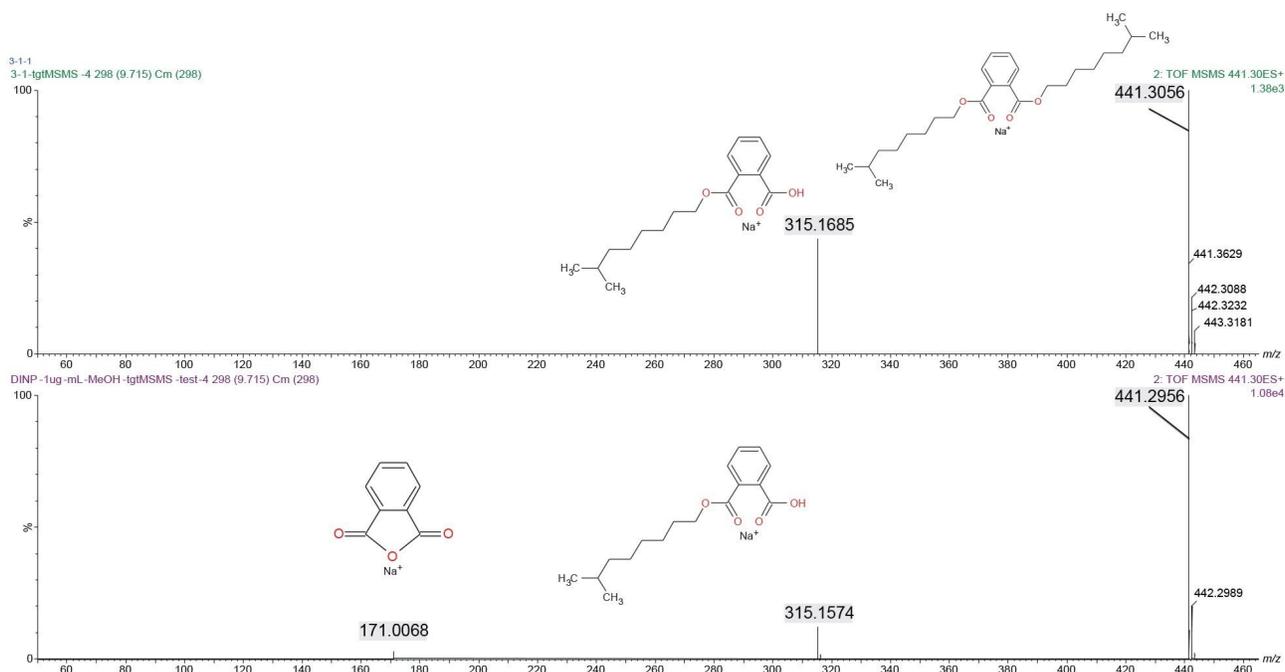


图7.使用25–90 eV的梯度碰撞能量比较DNIP标准和劣质rLDPE提取物中 $m/z$  441.2956的碎片离子谱图。

标准和劣质rLDPE提取物中 $m/z$  441的碎片离子谱图非常相似（图7）。在劣质rLDPE提取物中未观察到 $m/z$  171.0106。这可能是由于样品中母离子的实际浓度与标准品中的浓度(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )相比较低。然而，在 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 碎片离子谱图中观察到邻苯二甲酸酯 $m/z$  149.0283的特征碎片（数据未显示）。如预期一样，DINP钠加合物非常稳定，需要高达90 eV的碰撞能量才能破坏稳定的结构。因此，一旦产生碎片，就会被检测为钠加合物。图7上的结构是建议的碎片归属。

本研究通过使用化学品标准品并比较质子化和钠化加合物的保留时间和碎片离子谱图，将检测到的化合物 $m/z$  419.3161和 $m/z$  441.2981可靠地鉴定为DINP。通过应用相同的方法鉴定了几种其他化合物：邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)和油酸酰胺。

---

## 结论

在本应用纪要中，我们将ACQUITY Premier LC与Xevo G3 QTof高分辨率质谱和软件工具结合使用，开发出一种新颖的分析方法来区分rLDPE的质量。

通过分析不同批次的迁移化合物，在ESI正离子模式下至少鉴定了四种重要标志化合物，可用于区分劣质rLDPE和优质rLDPE。此外，这种方法可以轻松转移到使用串联质谱法对这些化合物进行的绝对定量中。

---

## 参考资料

1. Center for International Environmental Law (<https://www.ciel.org/issue/fossil-fuels-plastic/> <  
<https://www.ciel.org/issue/fossil-fuels-plastic/>> ).
2. UN plastic general assembly (<https://www.un.org/pga/73/plastics/> <  
<https://www.un.org/pga/73/plastics/>> ).
3. M. J. Martínez-Bueno, M. J. Gómez Ramos, A. Bauer, A. R. Fernández-Alba. An Overview of Non-targeted Screening Strategies Based on High Resolution Accurate Mass Spectrometry for the Identification of Migrants Coming From Plastic Food Packaging Materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 110: 191–203 (2019).
4. K. J. Groh, B. Geueke, O. Martin, M. Maffini, J. Muncke. Overview of Intentionally Used Food Contact Chemicals and Their Hazards. *Environ.Int.* 150:106225 (2021).
5. K. J. Groh, T. Backhaus, B. Carney-Almroth, B. Geueke, P. A. Inostroza, A. Lennquist, H. A. Leslie, M. Maffini, D. Slunge, L. Trasande, A. M Warhurst, J. Muncke. Overview of Known Plastic Packaging-Associated Chemicals and Their Hazards. *Science of the Total Environment*. 651: 3253–3268 (2019).
6. D. Broadhurst, R. Goodacre, S. N. Reinke, J. Kuligowski, I. D. Wilson, M. R. Lewis, and W. B. Dunn. Guidelines and Considerations for the Use of System Suitability and Quality Control Samples in Mass Spectrometry Assays Applied in Untargeted Clinical Metabolomic Studies. *Metabolomics*. 14: 72-89 (2018).

7. E. L. Schymanski, H. P. Singer, J. Slobodnik, I. M. Ipolyi, P. Oswald, M. Krauss, T. Schulze, P. Haglund, T. Letzel, S. Grosse, N. S. Thomaidis, A. Bletsou, C. Zwiener, M. Ibáñez, T. Portolés, R. de Boer, M. J. Reid, M. Onghena, U. Kunkel, W. Schulz, A. Guillon, N. Noyon, G. Leroy, P. Bados, S. Bogialli, D. Stipanich, P. Rostkowski, J. Hollender. Non-target Screening With High-Resolution Mass Spectrometry: Critical Review Using a Collaborative Trial on Water Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407:6237–6255 (2015).

---

## 特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo G3 QTof <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html>>

720007837ZH, 2023年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号