



Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry

作者：

Wilhad M. Reuter

Jamie Foss

PerkinElmer Inc.
Shelton, CT

利用 UHPLC-MS/MS 对河水中的药品和个人护理用品进行分析

简介

药品和个人护理用品（PPCPs）是一类新兴的环境污染物，其中包括处方药、非处方药、防晒霜、乳液、肥皂和驱虫剂。这些常见产品通过各种途径（包括生活污水）进入

环境。对地表水，尤其是河流和湖泊中的这类污染物进行定性定量，正在成为越来越引人关注的焦点。

分析面临的挑战在于，这类污染物包含多种化学成分，并且在地表水中含量极低，水平在 ppm ($\mu\text{g/mL}$) 甚至 ppt (pg/mL) 级^{1,2}。因此，开发一种既能够保证有效色谱分离又能够实现最佳分析灵敏度的分析方法是一项艰巨的任务。通常情况下，一次进样对所有成分实现精确定量几乎不可能。

本文介绍了利用 UHPLC-MSMS 对河水中 31 种 PPCPs 进行定性和定量的应用。UHPLC-MSMS 非常适合此类分析，因为 UHPLC 可提供最佳的色谱分离效果，而串联四极杆（MSMS）可提供最佳的灵敏度和选择性。MSMS 还可以通过待测化合物离子碎片和离子比的独特组合进行阳性判定。

实验

硬件 / 软件

使用 PerkinElmer LX50 UHPLC 系统进行色谱分离，并使用 PerkinElmer QSight™ 220 MS/MS 进行检测。使用 Simplicity 3Q™ 软件平台进行仪器控制、分析和数据处理。

方法参数

LC、MS/MS 方法 / 离子源参数分别如表 1、2、3 所示。

溶剂和标准

使用的溶剂、试剂和稀释剂为 HPLC 等级或更高等级。PPCPs 标准样品（表 2 所述）的购买如下：药品混合物 1 号和 2 号（分别称为 PharmMix1 和 Pharmmix2）购自宾夕法尼亚州贝尔丰特的瑞斯泰克；其他 PPCPs 购自威斯康星州密尔沃基的 Sigma-Aldrich® Inc.。

表 1、LC 方法参数

色谱柱	PerkinElmer Brownlee 3.0 x 100-mm C18 SPP, 2.7 µm (货号 N9308410)					
流动相	溶剂 A: 5 mM 甲酸铵溶于 0.1% 甲酸水溶液					
	溶剂 B: 含 0.1% 甲酸的乙腈					
	步骤	时间 (分)	流速 (毫升 / 分)	%A	%B	曲线
	1	初始	0.6	100	0	
	2	0.50	0.6	100	0	
	3	2.00	0.6	60	40	线性
	4	7.00	0.6	3	97	线性
	5	7.50	0.6	100	0	线性
	6	11.00	0.6	100	0	
分析时间	6 分钟; 再平衡时间: 3.5 分钟					
压力	3000 psi/207 bar (最大值)					
箱温	35 °C					
注入体积	50 µL					

表 2、MS/MS 方法参数

分子	ESI 模式	保留时间 (Min)	实验分组	母离子	碎片离子 1 (定量)	EV1	CCL2	CE1	碎片离子 2 (定性)	EV1	CCL2	CE1
对乙酰氨基酚	+	2.09	A	152.1	110.0	20	-34	-25	65.3	20	-35	-25
乙酰唑胺	+	2.19	A	223.2	181.2	25	-65	-40	73.0	25	-68	-46
布他比妥	-	3.15	D	223.1	42.1	-20	50	25	NA	7.69	25.60	101.24
咖啡因	+	2.27	B	195.0	83.3	20	-35	-25	138.2	20	-60	-50
立痛定	+	3.28	D	237.2	193.3	25	-55	-49	179.2	25	-56	-50
环丙沙星	+	2.23	B	332.5	314.0	20	-55	-25	231.2	20	-111	-49
氯四环素	+	2.52	B	479.5	154.2	20	-140	-50	98.3	20	-160	-70
可待因	+	2.05	A	300.5	165.3	25	-82	-58	153.2	25	-82	-58
可铁宁	+	1.77	A	177.2	80.3	25	-44	-31	98.2	25	-90	-79
环磷酰胺	+	2.89	C	261.3	140.4	25	-45	-29	63.1	25	-55	-50
安定	+	4.22	D	285.4	193.0	25	-81	-42	154.0	25	-90	-80
双氯芬酸	+	4.81	D	296.4	214.4	25	-90	-49	133.2	25	-65	-40
1,7- 二甲黄嘌呤	+	2.08	A	181.2	124.2	25	-35	-29	69.3	25	-40	-43
苯海拉明	+	2.74	C	256.5	167.2	25	-55	-40	165.3	25	-70	-48
强力霉素	+	2.57	B	445.6	428.2	25	-130	-30	267.2	25	-130	-53
红霉素	+	2.73	C	735.1	158.3	20	-110	-39	116.3	20	-111	-50
雌激素酮	+	4.24	D	271.4	133.2	25	-90	-28	157.2	-25	-90	-23
氟苯氧丙胺	+	2.97	C	310.4	44.5	20	-56	-48	NA			
二甲苯氧庚酸	-	5.49	D	249.3	121.2	-20	55	20	127.0	-20	55	20
酪洛芬	+	3.96	D	255.4	105.2	20	-50	-38	77.3	20	-104	-62
二甲双胍	+	0.67	A	130.2	71.4	25	-35	-37	43.4	25	-64	-48
二甲胺四环素	+	2.16	A	458.5	352.1	20	-150	-46	283.2	20	-150	-65
萘普生	+	4.00	D	231.2	170.2	20	-80	-35	153.3	20	-80	-45
青霉素 G	-	3.22	D	333.2	74.1	-20	65	40	192.1	-20	65	40
青霉素 V	+	3.43	C	351.4	160.1	20	-62	-15	114.0	20	-62	-48
雷尼替丁	+	1.94	A	315.6	102.2	20	-130	-45	125.2	20	-104	-62
磺胺甲恶唑	+	2.86	C	254.3	92.2	20	-56	-46	108.2	20	-56	-47
四环素	+	2.32	B	445.6	154.1	20	-160	-38	98.1	20	-130	-57
反胺苯环醇	+	2.39	B	264.4	58.0	25	-90	-75	121.0	25	-90	-75
三氯生	-	5.85	D	287.1	35.2	-20	45	32	NA			
甲氧苄氨嘧啶	+	2.20	B	291.4	123.2	20	-75	-40	110.3	20	-56	-48

EV (V) = 入口电压; CCL2 (V) = 碰撞池透镜电压 2; CE (V) = 碰撞能量;

NA = 不可用

驻留 (循环) 时间: 10 msec (所有待测组份); 实验分组: A (0.0 – 2.4 min), B (2.0 – 2.8 min), C (2.45- 2.63 min), D (2.9 – 6.0 min)。

表 3、MS/MS 离子源参数

参数	设置
电离方式	ESI；正离子和负离子，取决于待测组份类别
干燥气	120
HSID 温度 (°C)	320
雾化气	275
电喷射电压 (V)	4850 (正离子模式) -4850 (负离子模式)
离子源温度 (°C)	420

标准品和样品制备

对于液体标准品，按照以下方法制备一份 1-μg/mL (ppm) 标准储存溶液：将 500 uL 药品混合物 1 号和 2 号（各 200 μg/mL，与甲醇混合）加入到 100-mL 量瓶内。同时将 100 uL 可待因、可铁宁、安定、布他比妥和反胺苯环醇（各 1000 μg/mL，与甲醇混合）加入瓶内。然后用 10% 甲醇 / 水定容。

对于固体标准品，将各 10 mg 标样加入 1000-mL 量瓶，然后用甲醇定容（某些待测组份溶于甲醇）。搅拌该溶液 20 分钟，使所有固体标准品完全溶解，然后用水进一步稀释 10 倍，形成 1 μg/mL 的标准储存溶液。

然后将两种标准储存溶液 1:1 混合，制成含有 0.5 μg/mL 各种待测组份的标准混合溶液。将其进一步用水进行 1:1 稀释，制成工作标准混合溶液 (WS)，在 5% 甲醇 / 水中含有 0.25 μg/mL 各待测组份。用 5% 甲醇 / 水连续稀释工作标准混合溶液，制成 0.025-250 ng/mL ((ppb) 校准标准溶液。

从当地河流收集两份河水样品，一份来自纽约冷泉的哈得逊河，一份来自康涅狄格州斯特拉特福德德的胡萨托尼克河。首先使用 0.45-μm 尼龙过滤器过滤各样品，然后将 50 μl 过滤样品直接注入色谱仪进行分析。

为避免交叉污染，每两个样品间利用 5% 甲醇 / 水空白进行冲洗。

标准溶液和样品均一次进样重复分析 3 次取平均值。

结果和讨论

图 1 显示了含所有被分析 PPCPs 的工作标准混合溶液的总离子色谱图 (TIC)，其中近 20 种化合物得到很好地分离。保留时间接近的 PPCPs 利用 MW 转换功能进一步分离。

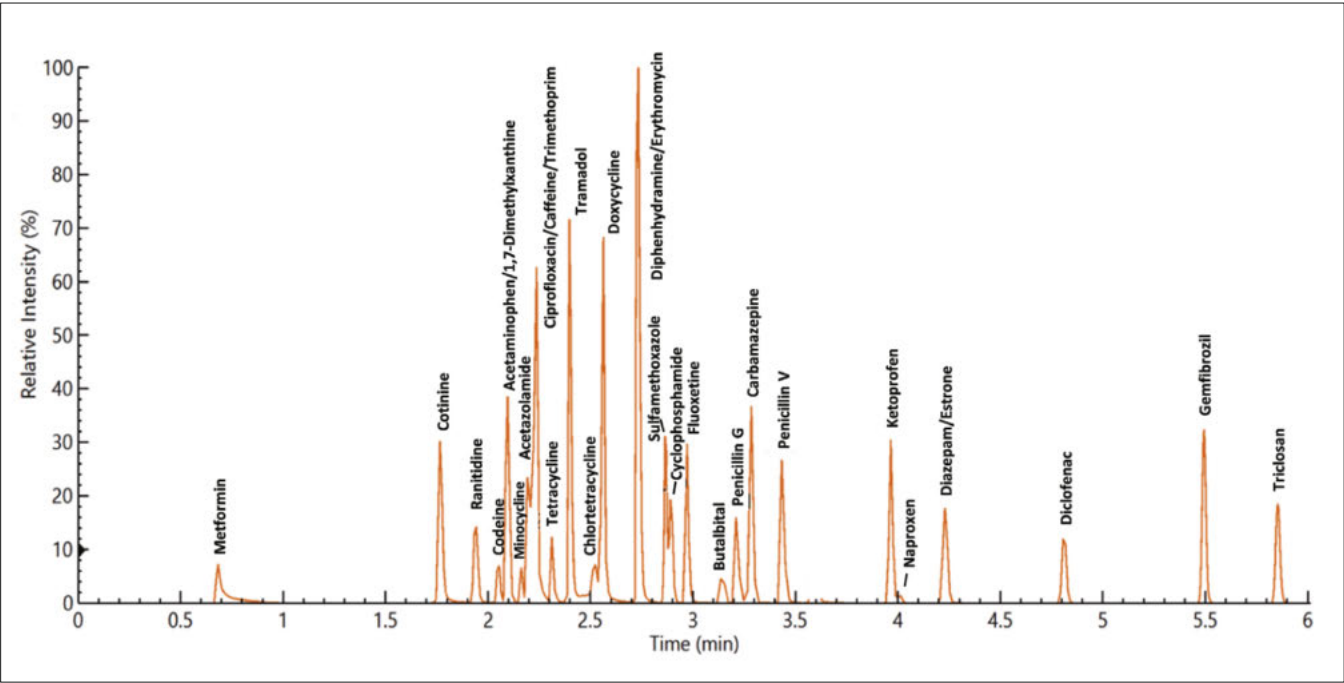


图 1、全部 31 种待测组份的总离子色谱图

图 2 为六种待测 PPCPs 在八次重复进样中的叠加 MRM（多反应监测）色谱图，显示了出色的重复性。

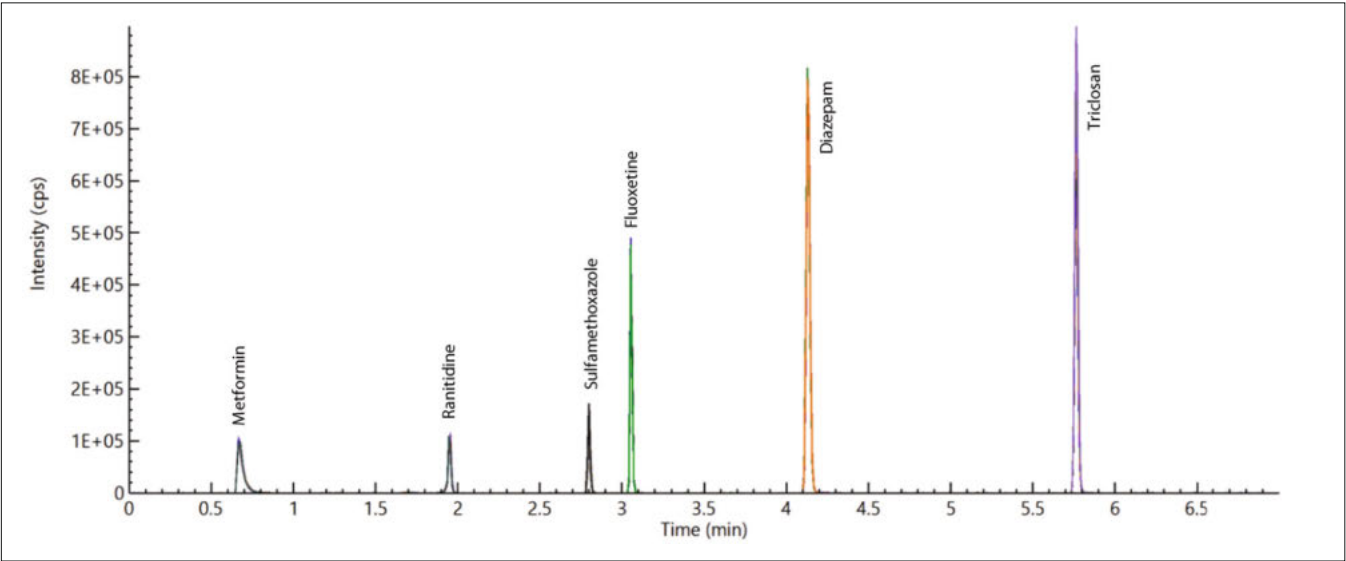


图 2、250-ppb PPCPs 工作标准混合溶液在八次重复进样中的叠加。为清楚起见，对六种均匀分布的待测组份进行了多反应监测（二甲双胍、雷尼替丁、磺胺甲恶唑、布他比妥、安定和三氯生）

图 3 为六种代表性 PPCPs 的校准曲线。31 种待测组份的 R^2 值范围为 0.9944-0.99989。这基于至少五个校准水平，取决于不用待测组份的灵敏度。

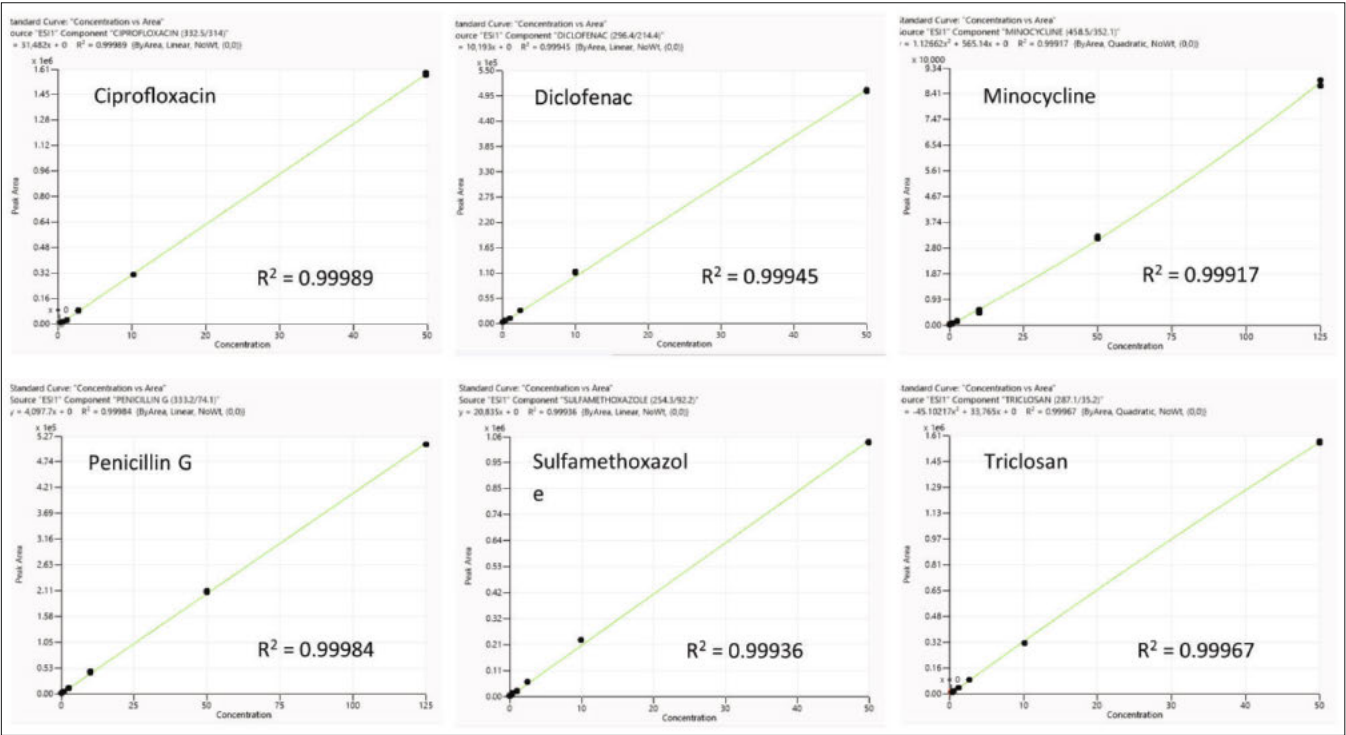


图 3、六种代表性 PPCPs 的校准曲线

31 种待测 PPCPs 的定量限如表 4 所示，其中大多数数值在较低 ppt 范围内。这基于各待测组份所用最低校准水平的信噪比计算得到。最低校准水平取决于各待测组份的灵敏度。而数据的离散性反映了 PPCPs 类化合物的多样性。

胡萨托尼克河和哈得逊河河水样品的 PPCPs 的总离子色谱图（TIC）曲线如图 4 所示。注释为色谱峰保留时间。

表 4、31 种待测 PPCPs 的定量限

分子	定量限 * (ppt; pg/mL)	分子	定量限 * (ppt; pg/mL)
对乙酰氨基酚	32.5	雌激素酮	202.8
乙酰唑胺	15.5	氟苯氧丙胺	16.3
布他比妥	1988	二甲苯氧庚酸	5.0
咖啡因	94.2	酪洛芬	37.3
立痛定	5.3	二甲双胍	1.9
环丙沙星	11.0	二甲胺四环素	31.5
氯四环素	843.5	萘普生	272.8
可待因	9.9	青霉素 G	20.1
可铁宁	5.6	青霉素 V	9.7
环磷酰胺	4.4	雷尼替丁	7.3
安定	9.9	磺胺甲恶唑	7.7
双氯芬酸	7.6	四环素	57.6
1,7- 二甲黄嘌呤	2.3	反胺苯环醇	3.2
苯海拉明	2.2	三氯生	8.8
强力霉素	2.9	甲氧苄氨嘧啶	9.2
红霉素	153.7		

* 基于信噪比≥ 10（三次进样的平均值）。

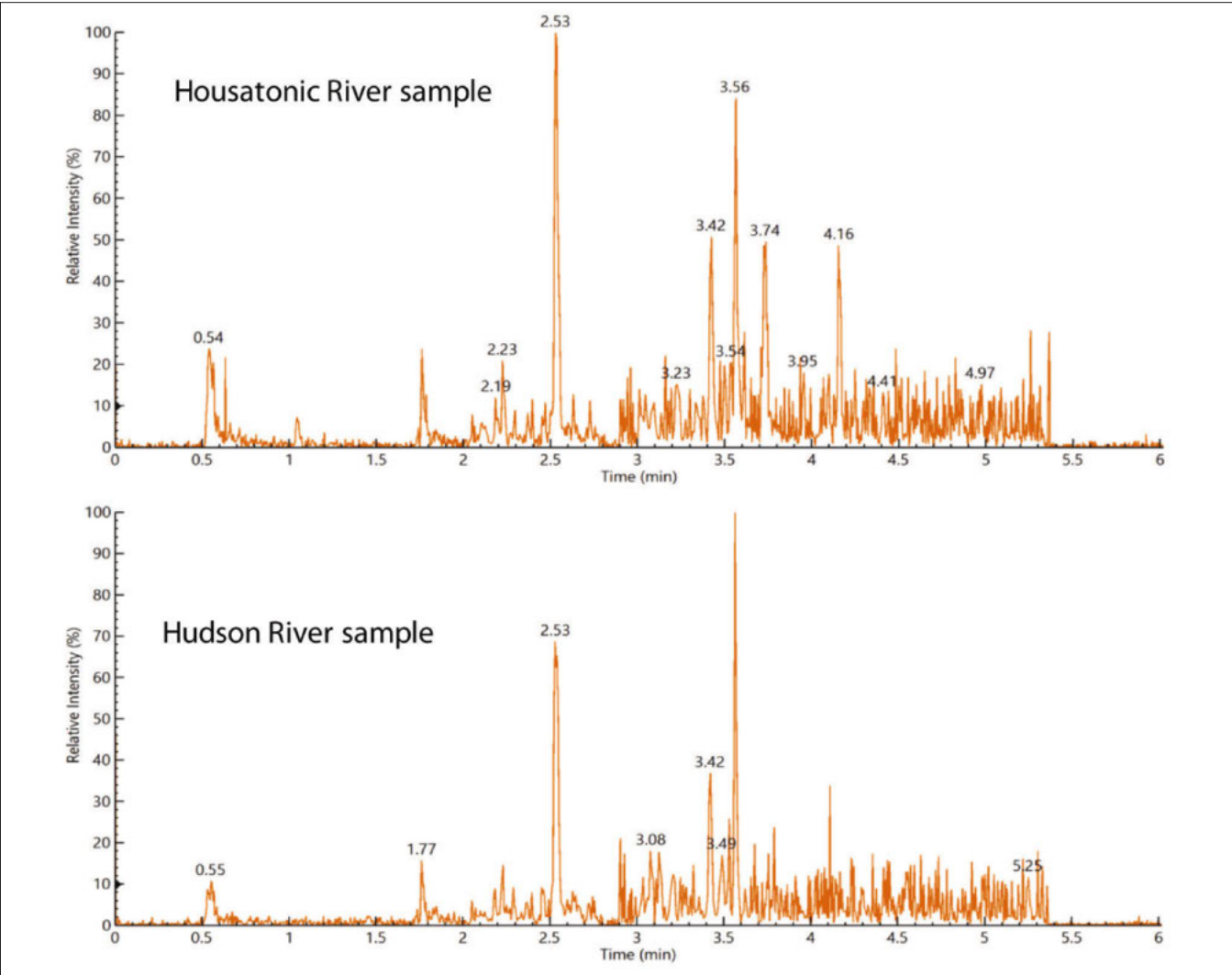


图 4、两份河水样品的总离子色谱图（TIC）曲线

图 5 为两条河水中可定量的 PPCPs 的 MRM 色谱图，如各标签所示。

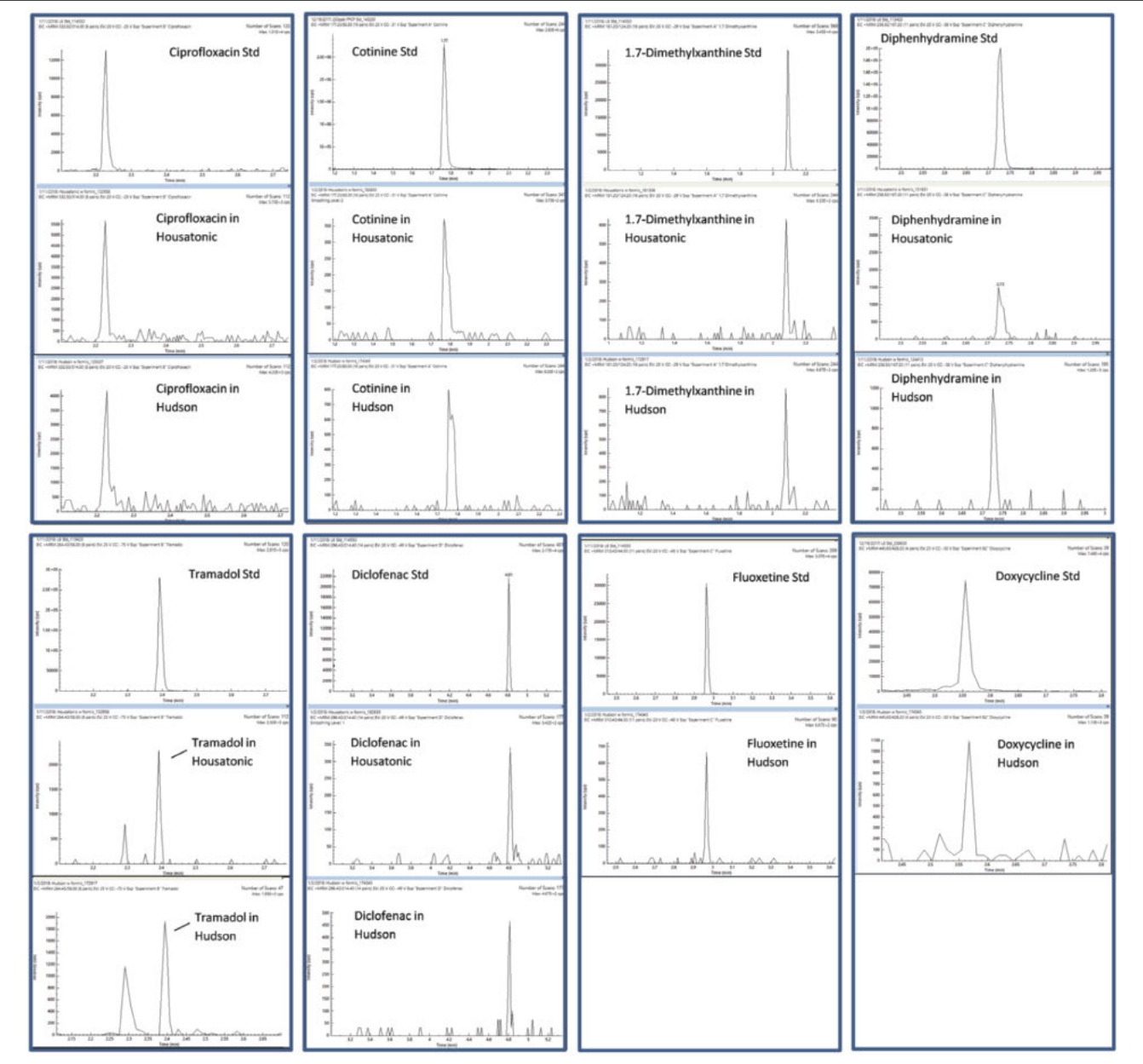


图 5、各河水样品中可定量的 PPCPs 的多 MRM 色谱图

如表 5 所示,在两份河水样品中发现了 ppt(pg/mL)水平的反胺苯环醇、可铁宁、环丙沙星、1,7-二甲黄嘌呤、苯海拉明和双氯芬酸。仅在哈得逊河水样品中发现了可定量的强力霉素和氟苯氧丙胺,在胡萨托尼克河水样品中发现了氟苯氧丙胺的痕迹。在哈得逊河水样品中也发现了对乙酰氨基酚、磺胺甲恶唑和二甲苯氧庚酸,但仅限痕量级。未在河水样品中检测到其他 PPCPs。

表 5、两份河水样品中 PPCPs 的检测结果

平均浓度 (ppt; pg/mL)						
	对乙酰氨基酚	环丙沙星	可铁宁	1,7-二甲黄嘌呤	苯海拉明	强力霉素
胡萨托尼克河	未检出	121.0	199.9	60.2	18.8	未检出
哈得逊河	痕量	76.2	101.2	61.8	37.0	23.8

平均浓度 (ppt; pg/mL)					
	氟苯氧丙胺	二甲苯氧庚酸	磺胺甲恶唑	反胺苯环醇	双氯芬酸
胡萨托尼克河	痕量	未检出	未检出	18.5	38.6
哈得逊河	84.0	痕量	痕量	11.6	118.0

为了检查可能的交叉污染或背景干扰，在校准组和样品之后，由 5% 甲醇 / 水组成的空白样也进行了分析。未观察到任何待测组份的残留。

对于待测组份的确认，使用定性 / 定量离子比率，并保证 20% 的容许限度。对于许多待测组份，这适用于最低校准物浓度 (25 ppt)。单个校准水平以及实际样品的苯海拉明离子比率示例如表 6 所示。对于定性离子明显较弱的组份，该比率适用于较低的 ppb 水平。对于布他比妥、氟苯氧丙胺和三氯生，并未确定合适 / 稳健的定性碎片。

结论

- 使用 PerkinElmer LX50 UHPLC/QSight 220 MS/ MS 系统开发了一套 LC-MS/MS 方法，并演示了其在对河水中 31 种 PPCPs 分析过程中的有效性。
- 所述方法 / 步骤可在 6 分钟内对 PPCPs 进行快速、可靠的直接进样分析。对大多数组份而言，样品分析时间低于 10 分钟，定量限处于低 ppt 水平。

表 6、实际样品校准水平上苯海拉明的离子比率。(定量离子对: 256.5/167.2; 定性离子对: 256.5/165.3)

标准品 / 样品	离子比率 (峰面积积分, 三次进样的平均值)
L1 (25 ppt)	0.43
L2	0.40
L3	0.38
L4	0.41
L5	0.40
L6	0.40
L7	0.40
L8 (50 ppb)	0.40
胡萨托尼克河河水样品	0.35
哈得逊河河水样品	0.42

参考文献

1. Daughton, C.G., Jones-Lepp, T.L., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the environment. Scientific and Regulatory Issues, ACS Symp. Ser. 791, Oxford University Press, Washington, U.S. (2001).
2. Daughton, C.G., Environ. Impact Assess. Rev. 24 (2004) 711.

珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司
地址: 上海 张江高科技园区 张衡路 1670 号
邮编: 201203
电话: 021-60645888
传真: 021-60645999
www.perkinelmer.com.cn



要获取我们位于全球的各个办公室的完整列表，请访问 www.perkinelmer.com/ContactUs

版权 ©2018, 珀金埃尔默公司。版权所有。PerkinElmer® 是珀金埃尔默公司的注册商标。所有其他商标属于相应所有者的财产。