

# 采用高分辨质谱分析法 (LC/Q-TOF/MS) 检测水中的药物

## 应用简报

环境

### 作者

Imma Ferrer 和 E. Michael Thurman  
环境质谱分析中心  
环境工程系  
科罗拉多大学  
波尔得，科罗拉多州  
美国

### 摘要

使用安捷伦四极杆飞行时间质谱仪和软件工具能够鉴定和表征水源中浓度低至万亿分之一 (ppt) 级别的 100 多种药物及其代谢物，包括那些使用其他方法很难区分开的同重化合物以及同分异构体。

### 前言

距离首次报道环境中的药物残留已经过去了二十多年。服用的药物从人体内排出后会进入污水处理厂，它们在污水处理厂中不能被完全去除，最终会进入到环境中。这些药物在环境中无处不在，它们可能会存在于废水、地表水以及地下水中。这些药物，尤其是抗抑郁类药物和  $\beta$ -受体阻滞剂在环境中的浓度越来越高 [1]。

为了确定药物残留的潜在健康风险，监测水体中的药物浓度正日益受到全球监管机构的关注。但是，此类药物的浓度通常都非常低 (ng/L 水平)，所以我们需要使用高选择性、高灵敏度的检测方法。同时也需要使用非靶向方法，以确保能够检出所有的药物污染物及其降解产物和代谢物 [2]。

采用液相色谱/四极杆飞行时间质谱 (LC/Q-TOF/MS) 的方法能够提供药物分析所需要的灵敏度和选择性，还能对水中的药物进行非靶向筛查。本应用简报介绍了使用 Agilent 6540 四极杆飞行时间液相色谱质谱联用系统和相关软件工具（包括分子特征提取器、分子式生成器和精确质量数据库）来检测、鉴定和定量水中超低浓度的药物。

## 实验部分

### 试剂和标样

所有的标准溶液 (100 µg/mL) 均购自 Cerrilant（美国德克萨斯奥斯汀）。氘代标样购自 Cambridge Isotopes（美国马萨诸塞州剑桥）。高效液相色谱级乙腈和甲醇购自 Burdick and Jackson（美国密歇根马斯基根）。甲酸购自西格玛奥德里奇公司（美国密苏里州圣路易斯）。用纯甲醇将 100 µg/mL 的标液稀释成 1 µg/mL 的单标储备液并于 -18 °C 下保存。用乙腈和水将储备液稀释成 10% 乙腈和 90% 水的混合液，以此作为工作标准溶液用于液质联用分析。

### 仪器

本实验采用 Agilent 1200 Infinity 液相色谱系统，联用 6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量四极杆飞行时间液质联用系统。仪器条件见表 1。

### 样品前处理

采用自动化 Gilson SPE 系统和 Oasis HLB 小柱提取水样 (100 mL)，并用 6 mL 甲醇洗脱 [2]。用氮气蒸发装置在水浴中将甲醇洗脱液蒸至 0.5 mL 的最终体积。

### 数据分析

使用了包括分子特征提取器、分子式生成器、分子结构关联计算以及精确质量数据库等多种安捷伦软件工具来鉴定药物化合物。同时还使用了包括氯过滤器在内的开发人员改编版软件 [3]。

表 1. 液相色谱和四极杆飞行时间质谱条件

液相色谱运行条件	
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse XDB C8 色谱柱， 4.6 × 150 mm, 3.5 µm 填料 (部件号 963967-906)
柱温	25 °C
进样量	20 µL
流动相	A = 0.1% (体积比) 甲酸水溶液 B = 乙腈
线性梯度	10% B 保持 5 min， 然后在 25 min 时间里 B 由 10% 升高至 100%
流速	0.6 mL/min
四极杆飞行时间质谱条件	
离子模式	ESI，正离子模式和负离子模式
雾化器压力	45 psi
毛细管电压	3500 V
检测器采集速率	2 GHz
分辨率	在 $m/z$ 922 处为 25000
准确度	< 2 ppm

## 结果与讨论

### 检验水样中的药物

分子特征提取 (MFE) 能够将离子按化合物 (特征) 分组, 然后生成提取离子色谱图。MFE 可以提取强度最强的前 100 种化合物, 也可以根据需要提取前 1000 种甚至更多种化合物。提取的化合物越多, 研究样品所需要的时间也就越长。时间窗口也就需要做相应的调整。图 1 中所示为河水样品的总离子流图 (TIC), 该图中给出了样品中的 1498 种分子特征。

然后可以使用精确质量数据库根据精确质量数和保留时间来鉴定提取出来的分子特征。例如, 在 MFE 后使用安捷伦法医学数据库检测出了化合物加巴喷丁。图 1 中所示谱图是在没有使用 MS/MS 的情况下得到的。化合物右啡烷是止咳药右美沙芬的人类代谢产物, 可以根据去甲基右美沙芬的精确质量数鉴定水样中的右啡烷。借助上述以及其他工具, 我们从地表水中鉴定出了 100 多种药物化合物 [2]。

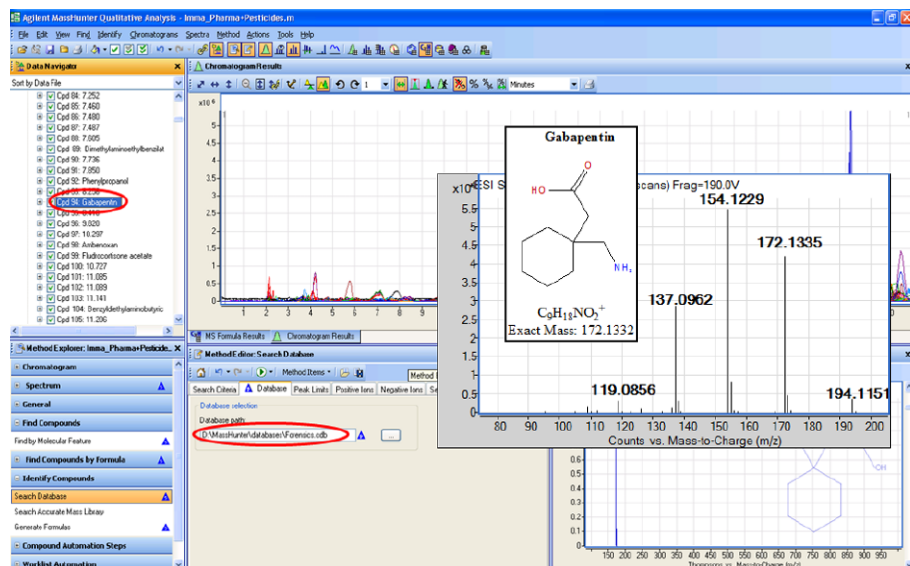


图 1. 河水样品的分子特征提取结果, 识别出了 1498 种分子特征。其中加巴喷丁是通过法医学数据库鉴定出来的

# 表征水样中的药物

许多软件工具都可以用于鉴定特定药物及其代谢产物。例如，我们通过改编 MFE 和分子式生成器 (MFG) 得到了氯质量数过滤器软件工具，并借助该工具在河水样品中发现了抗抑郁药拉莫三嗪 [3]。我们先运行 MFE，然后设置 MFG 以包含至少一个氯原子。

在这个例子中，我们设置的氯原子数最多为两个，最少为一个。然后软件会将从 MFE 得到的所有含氯原子的化合物进行分类，从而鉴定出拉莫三嗪（图 2）。

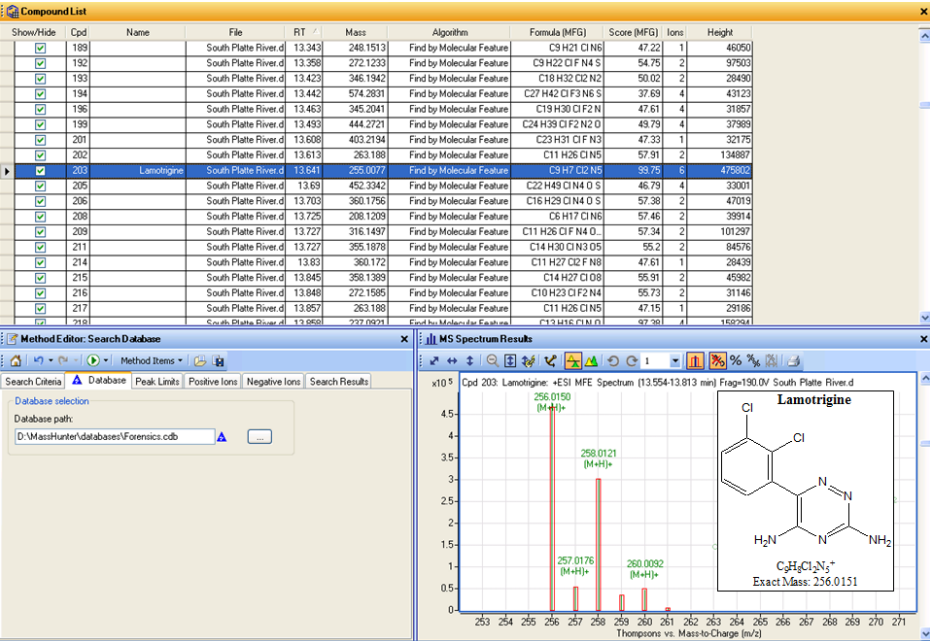


图 2. 使用氯质量数过滤器鉴定拉莫三嗪

使用诊断离子工具和 MS/MS 分析还能鉴定出水样中拉莫三嗪的代谢物。在提取  $m/z$  256 离子后，所得到的离子色谱图在这个名义质量数处包含多个离子。在大约 9 min 处的其中一个峰的质量数与拉莫三嗪完全相同，说明这是拉莫三嗪的异构体或相关代谢物。全谱显示的名义质量数为  $m/z$  432，其与  $m/z$  256 相差一个葡萄糖苷酸，或者 176 个质量数单位。哺乳动物的药物新陈代谢过

程通常会产生葡萄糖苷酸。我们开展了两个 MS/MS 实验来确认拉莫三嗪的代谢物。首先，对  $m/z$  432 离子进行 MS/MS 分析以证明  $m/z$  256 离子来源于  $m/z$  432 离子（图 3）。然后，通过增加碎裂电压并对  $m/z$  256 进行 MS/MS 分析开展伪 MS<sup>3</sup> 实验，得到与母体化合物拉莫三嗪一致的谱图（图 3）。通过分析 2-N-葡萄糖苷酸拉莫三嗪的纯标准品也证实了这一发现。

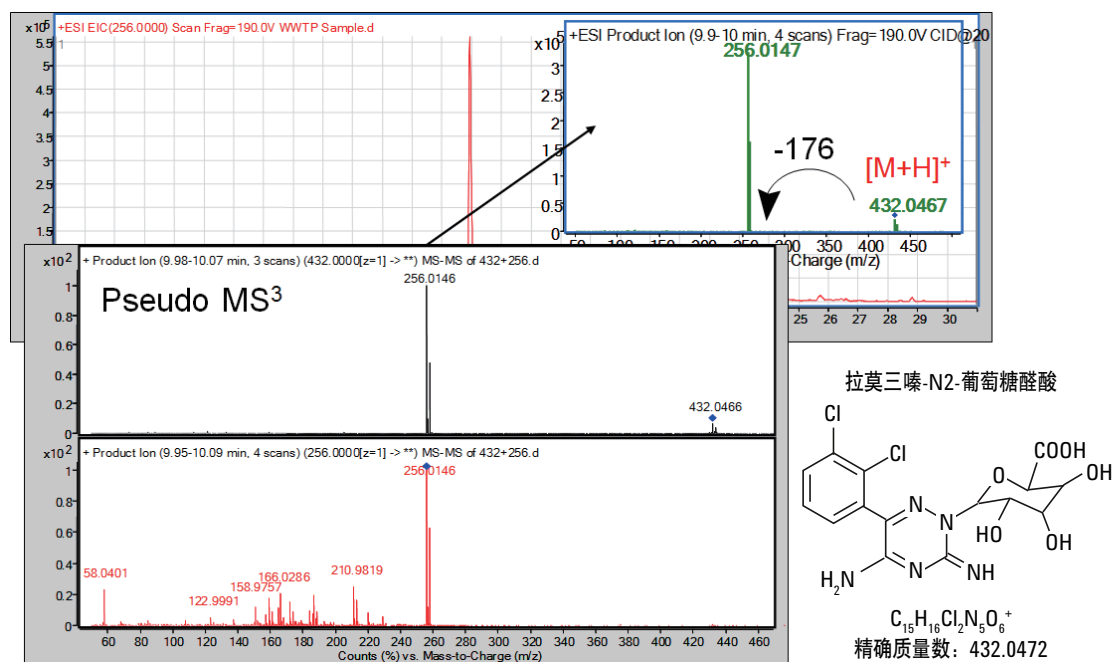


图 3. 用于确认拉莫三嗪葡萄糖苷酸代谢物的诊断离子和 MS/MS 分析

## 区分同分异构体和同重化合物

四极杆飞行时间质谱仪是区分和鉴定水样中药物同重化合物和同分异构体的必要工具。同重化合物具有相同的名义质量数，而同分异构体有着相同的分子式以及相同的精确质量数。我们可以根据精确质量数分离同重化合物，但是分离同分异构体通常需要同时使用 MS/MS 和色谱分离技术。同分异构体在保留时间、精确质量数和 MS/MS 碎裂上的差异，以及特征同位素签名和同位素质量亏损都可以用于同分异构体的阳性鉴定 [2,4]。

废水中通常会发现同重的药物化合物对：拉莫三嗪和羟基安非他酮，这两种物质的保留时间仅相差 0.2 min。但是它们的精确质量数相差 0.0948 个质量数单位。LC/Q-TOF/MS 在 25000 的分辨率下能够实现  $m/z$  256.0149 和 256.1096 的基线分离。在该条件下不仅这些离子可以实现分离，它们的同位素签名也在谱图中实现了基线分离（图 4）。值得注意的是拉莫三嗪有两个氯同位素模式，羟基安非他酮有一个氯同位素模式。一个氯原子在 A+2 处能给出大约 30% 的同位素模式，两个氯原子在 A+2 处能给出大约 60% 的同位素模式 [3]。我们对质谱图进行叠加以显示质谱仪的分辨能力。

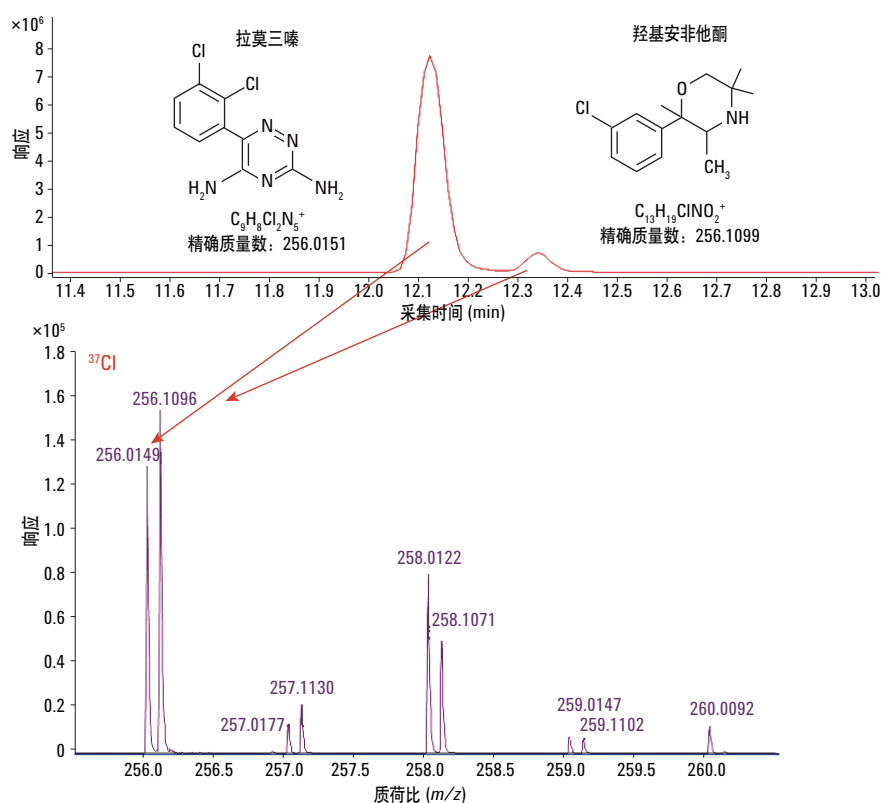


图 4. 借助精确质量数区分同重化合物对。拉莫三嗪和羟基安非他酮相差 0.0948 个质量数单位，在保留时间上相差 0.2 min。请注意，这两种化合物的同位素签名实现了基线分离

去甲基文拉法辛和曲马多是一对同分异构药物化合物，它们有着相同的分子式，因而精确质量数也相同 ( $m/z$  264.19587)。它们在保留时间上有细微的差别，但是它们的两个碎片离子有着完全相同的精确质量数。而 MS/MS 能够鉴定  $m/z$  201.1274 处的碎片离子，这个离子为去甲基文拉法辛所独有（图 5）。

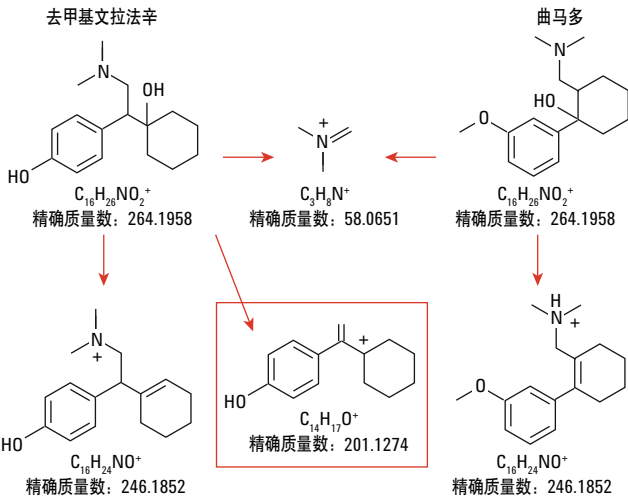


图 5. 用于区分去甲基文拉法辛和曲马多同分异构体的 MS/MS 离子对

### 监测水源中的药物

6540 超高分辨率 (UHD) 精确质量数四极杆飞行时间液质联用系统的精确质量数分析能力以及软件工具能够监测不同水源中的 100 多种药物。在这些化合物及其代谢物中，有 14 种在美国的地表水中是最常见的（表 2 中以黄色突出显示的化合物）。其中很多都是抗抑郁类药物及其代谢物以及一些抗生素 [2]。值得注意的是，拉莫三嗪广泛存在于地表水中（在地表水源中的检出率为 97%），平均浓度大于 400 ng/L。我们的研究表明这些化合物在污水和下游水体中以及地下水中的浓度存在着一定的关系 [1]。

表 2. 美国境内地表水中发现的 36 种药物的鉴定结果，包括他们的平均浓度以及在水样中的检出率。以黄色突出显示的是最常检出的药物

化合物	在水样中的检出率 (%)	平均浓度 (ng/L)
1,7-二甲基黄嘌呤	10	110
10,11-二羟基-卡马西平	45	80
10-羟基-卡马西平	85	255
阿替洛尔	74	166
安非他酮	68	140
咖啡因	70	220
立痛定	95	350
西替利嗪	82	70
西酞普兰	79	85
甲红霉素	75	46
可铁宁	22	40
去甲基-右啡烷	65	10
去甲基文拉法辛	78	84
右啡烷	75	50
地尔硫卓	69	47
苯海拉明	80	57
赤式羟基安非他酮	78	180
红霉素	55	137
无水红霉素	35	62
氟西汀	25	65
加巴喷丁	44	54
吉非罗齐	74	95
羟基安非他酮	75	150
布洛芬	20	21
拉莫三嗪	97	455
美托洛尔	91	237
美托洛尔酸	85	74
2N-葡萄糖苷拉莫三嗪	68	95
萘普生	64	22
去甲基西酞普兰	66	74
心得安	88	53
新诺明	95	320
噻菌灵	75	188
三氯卡班	64	96
甲氧苄啶	76	264
文拉法辛	78	310



## 结论

安捷伦液相色谱/四极杆飞行时间质谱系统和软件是鉴定和表征水源中多种药物的强大工具。快速分析能够监测十亿分之一 (ppb) 甚至万亿分之一 (ppt) 级别的 100 多种已知药物。分子特征提取器、分子式生成器、分子结构关联计算、碎裂途径以及氮质量数过滤器都可以用于表征单个化合物及其代谢物。四极杆飞行时间分析尤其适用于分离和鉴定同重化合物和同分异构体, 使用其他方法则很难分析这些化合物。

## 参考文献

1. J.H. Writer, I. Ferrer, L.B. Barber, and E.M. Thurman "Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals in and metabolites in 24 Minnesota Rivers and wastewaters" *Science of the Total Environment* 461-462, 519-527 (2013).
2. I. Ferrer, and E.M. Thurman "Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *J. Chromatography A* **1259**, 148-157 (2012).
3. I. Ferrer, and E.M. Thurman "Identification of a new antidepressant and its glucuronide metabolite in water samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry" *Anal. Chem.* **82**, 8161-8168 (2010).
4. E.M. Thurman, and I. Ferrer "The isotopic mass defect: A tool for limiting molecular formula by accurate mass." *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 2807-2816 (2010).

## 更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品与服务的信息, 请访问我们的网站: [www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)。

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2013  
中国印制  
2013 年 10 月 31 日  
5991-3261CHCN



**Agilent Technologies**