

Liquid Chromatography/
Mass Spectrometry

作者：

Jamie Foss

PerkinElmer, Inc.
Shelton, CT使用在线固相萃取——
超高效液相色谱 / 串联质谱
(SPE-UHPLC-MS/MS) 法分
析饮用水中 PPT 级的药物和
个人护理用品 (PPCPs)

简介

药物和个人护理用品 (PPCP) 是一类新兴的环境污染物, 包括人用和兽用处方药及非处方药、防晒霜、乳液、肥皂和驱虫剂。这些常见物质可以通过各种渠道进入环境中, 包括城市污水、受污染的地下水、地表水, 甚至饮用水。¹⁻³ 废水处理厂通常不具备去除 PPCP 的合适设

备。³

鉴定和量化饮用水中存在的化学污染物是一个日益受到关注的领域, 因为人们目前尚不了解长时间低浓度 PPCP 及混合物暴露的影响。^{2,3}

PPCP 检测面临的一大分析难题是饮用水中可能存在多种 PPCP, 且它们的浓度往往只有 PPT 级 (ng/L)。^{4,5} 因此, 开发一种能够在有效色谱分离和最佳分析物灵敏度之间取得平衡的最佳分析方法是一项艰巨的任务。根据以往的经验, 这通常需要根据主要待测物种类来进行取舍。

用于测定 PPCP 的传统分析方法的前处理方法为复杂且耗时的固相萃取 (SPE)，要求在通过 LC/MS/MS 进行分析之前，必须准备大量样品（通常为 1 升），以达到所需的检出限。^{3,6,7} 本文展示了通过自动在线固相萃取法与超高效液相色谱—串联质谱 (UHPLC-MS/MS) 法联用，对饮用水中浓度在低 PPT 级的十二种 PPCP 进行预富集、分离、检测和定量。

使用本文所述自动化方法，能够显著、有效地进行分析物浓缩，从而省略复杂且耗时的样品前处理程序，进而提高效率并减少溶剂使用量和实验室废弃物产生量。相比其他方法，本文所述方法因为经过富集，所以不再需要准备大量样品来达到苛刻的检出限。

实验

软 / 硬件

使用与 QSight 220 串联质谱联用的 PerkinElmer QSight® SP50 在线固相萃取系统对分析物进行自动在线预富集 / 富集和色谱分离，所有仪器控制、分析和数据处理均使用 Simplicity 3Q™ 软件平台进行。

在线固相萃取通过自动进样器中的两个附加六通阀和一个高压分离器 (HPD) 完成。根据图 1，阀 A 用于固相萃取，而阀 B 实现从直接进样到在线固相萃取模式的灵活切换。系统配置有一根 10 μL 不锈钢针、一个 1 mL 定量环、一个 1 mL 注射器和一个 2 mL 缓冲管。活化和平衡溶剂通过 HPD 输送，两种溶剂在通过固相萃取柱时被引导至废液。然后，使用自动进样器注射器将样品吸入定量环中，随后通过萃取的溶剂从定量环转移至固相萃取柱。然后，使用液相色谱梯度将分析物从固相萃取柱上洗脱至分析柱上。不需要采取单独的固相萃取洗脱步骤，因为集中在固相萃取柱上的分析物作为色谱分离操作的一部分将被直接洗脱至分析柱上。

表 1. 固相萃取法参数。

固相萃取柱	PerkinElmer 专用, 10 μm, 2.1 × 30 mm				
固相萃取溶剂	固相萃取溶剂 1 (活化): IPA/ACN/ 水 40/40/20, 加 1% 甲酸 固相萃取溶剂 2 (平衡 / 上样): 水加 0.1% 甲酸				
固相萃取程序	3x 重复进样				
	步骤	步骤类型	溶剂 1 (mL)	溶剂 2 (mL)	样品 (mL)
	1	洗脱 / 活化	2.0 1.5 mL/min	-	-
	2	平衡	-	2.0 1.5 mL/min	-
	3	进样至 1-mL 环内	-	-	1.5*
	4	进样至固相萃取柱上	-	1.25 1.0 mL/min	-
	5	进样至 1-mL 环内	-	-	1.5*
	6	进样至固相萃取柱上	-	1.25 1.0 mL/min	-
	7	进样至 1-mL 环内	-	-	1.5*
	8	进样至固相萃取柱上	-	1.25 1.0 mL/min	-
	* 固相萃取柱上的总进样量为 3.0 mL (使用固定环进样模式时, 吸入的 4.5 mL 样品中, 有 1.5 mL 样品会被浪费掉)。				

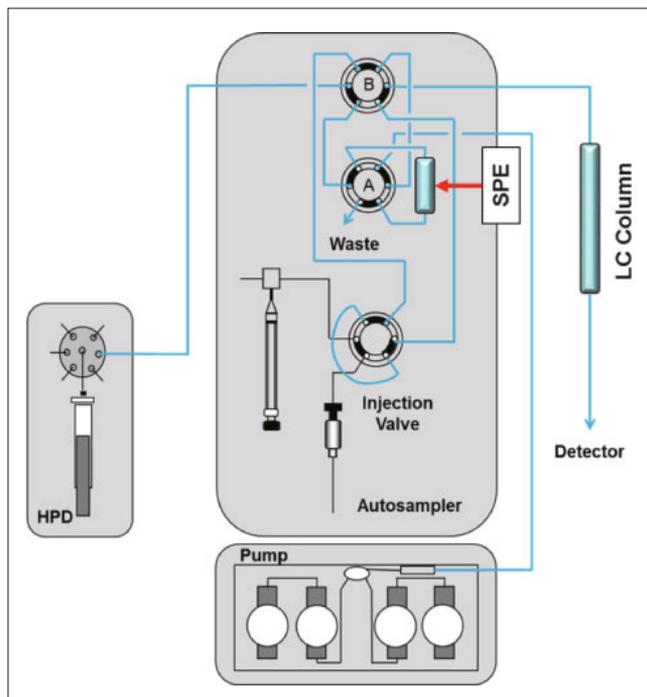


图 1. QSight® SP50 在线固相萃取 (SPE) 系统示意图。

就该方法而言，样品富集是通过 3 × 1000-μL 重复进样过程将总计 3 mL 的样品加载到固相萃取柱上来完成的。该方法的固相萃取参数如表 1 所示。

使用能够容纳 10 mL 样品瓶的 24 位进样器 (N9300922)。

方法参数

固相萃取、液相色谱和串联质谱方法参数如表 1-4 所示。

表 2. 液相色谱法参数。

液相色谱柱	PerkinElmer Brownlee SPP C18, 2.7 μ m, 3.0 \times 100 mm (货号 N9308410)			
固相萃取溶剂	溶剂 A: 水加 0.1% 甲酸			
	溶剂 B: 乙腈加 0.1% 甲酸			
	溶剂程序:			
	步骤	时间 (分钟)	流速 (毫升 / 分钟)	%A
	1	0.0	0.6	100
	2	2.0	0.6	60
3	7.0	0.6	3	
4	7.5	0.6	100	
5	11.0	0.6	100	
分析时间	7.0 min; 平衡时间: 4.0 min			
压力	最大 3500 psi/233 Bar			
柱温箱温度	30 $^{\circ}$ C			

表 3. 串联质谱法参数。

化合物	ESI 模式	保留时间 (分钟)	Time-Managed MRM	Q1 母离子	Q2 子离子	EV	CCL2	CE
甲氧苄氨嘧啶	+	1.98	1.50 – 2.40 min	291.4	123.2	20	-75	-40
甲氧苄氨嘧啶 *	+	1.98	1.50 – 2.40 min	291.4	110.3	20	-56	-48
依那普利	+	2.60	2.21 – 3.01 min	377.3	234.2	20	-76	-27
依那普利 *	+	2.60	2.21 – 3.01 min	377.3	91.1	20	-124	-88
红霉素	+	2.83	2.45 – 3.33 min	716.8	158.2	32	-144	-40
红霉素 *	+	2.83	2.45 – 3.33 min	716.8	83.1	19	-132	-70
磺胺甲恶唑	+	2.93	2.45 – 3.33 min	254.3	92.2	20	-56	-46
磺胺甲恶唑 *	+	2.93	2.45 – 3.33 min	254.3	108.2	20	-56	-46
氟苯氧丙胺	+	3.01	2.64 – 3.44 min	310.4	44.5	20	-56	-48
酰胺咪嗪	+	3.37	2.97 – 3.87 min	237.2	193.3	25	-55	-49
酰胺咪嗪 *	+	3.37	2.97 – 3.87 min	237.2	179.2	25	-56	-50
苯妥英	+	3.41	2.97 – 3.87 min	253.2	182.1	20	-56	-25
苯妥英 *	+	3.41	2.97 – 3.87 min	253.2	104.1	20	-100	-50
萘普生	+	4.23	3.83 – 4.63 min	231.2	185.1	10	-56	-20
萘普生 *	+	4.23	3.83 – 4.63 min	231.2	170.1	10	-60	-35
安定	+	4.51	4.12 – 4.92 min	285.3	154.1	20	-96	-38
安定 *	+	4.51	4.12 – 4.92 min	285.3	193.2	20	-108	-43
双氯芬酸	+	5.07	4.67 – 5.47 min	296.1	214.2	15	-84	-47
双氯芬酸 *	+	5.07	4.67 – 5.47 min	296.1	250.0	15	-60	-19
二甲苯氧庚酸	-	5.69	5.30 – 6.10 min	249.0	121.0	-5	36	20
二甲苯氧庚酸 *	-	5.69	5.30 – 6.10 min	249.0	127.1	-5	32	13
三氯生	-	6.17	5.79 – 6.60 min	286.9	35.1	-5	100	90

表 4. 串联质谱离子源参数

参数	值
电离模式	ESI; 正 / 负
干燥气体	120
HSID 温度 (°C)	250
雾化气体	200
电喷雾电压 (V)	5000/-4850
离子源温度	390
检测模式	Time-Managed MRM

溶剂、标样和样品

所有溶剂均为液相色谱—质谱级。PPCP 标样（列于表 3 中）的采购情况如下所示：药品混合物 1 和 2 购自宾夕法尼亚州贝尔丰特的 Restek；安定和苯妥英购自得克萨斯州朗德罗克的 Cerilliant；依那普利和双氯芬酸购自威斯康辛州密尔沃基的 Sigma-Aldrich® Inc.。使用甲醇将依那普利和双氯芬酸制

备成 1 mg/mL 标准储备液并储存在冰箱中。

使用甲醇将储备液稀释至 1 ppm，并使用 95:5 的水 / 甲醇溶液进一步稀释至 1 ppb 标准工作液。然后，使用甲酸（体积比 0.1%）酸化标准溶液，并让其在室温下静置 2 小时以稳定。然后，通过使用 95:5 的水 / 甲醇溶液作为稀释剂，对标准溶液进行连续稀释，以制备校准溶液。所有分析物的校准水平介于 1 至 250 ppt 之间。

收集两个自来水样品和三个瓶装水样品，用甲酸（体积比 0.1%）酸化，并让其在室温下静置 2 小时以稳定。使用 0.22 μm 尼龙滤头过滤样品。所有标样和样品均制备三份进行分析。

结果和讨论

图 2 显示了 250 ppt PPCP 标准混合物的色谱分离。

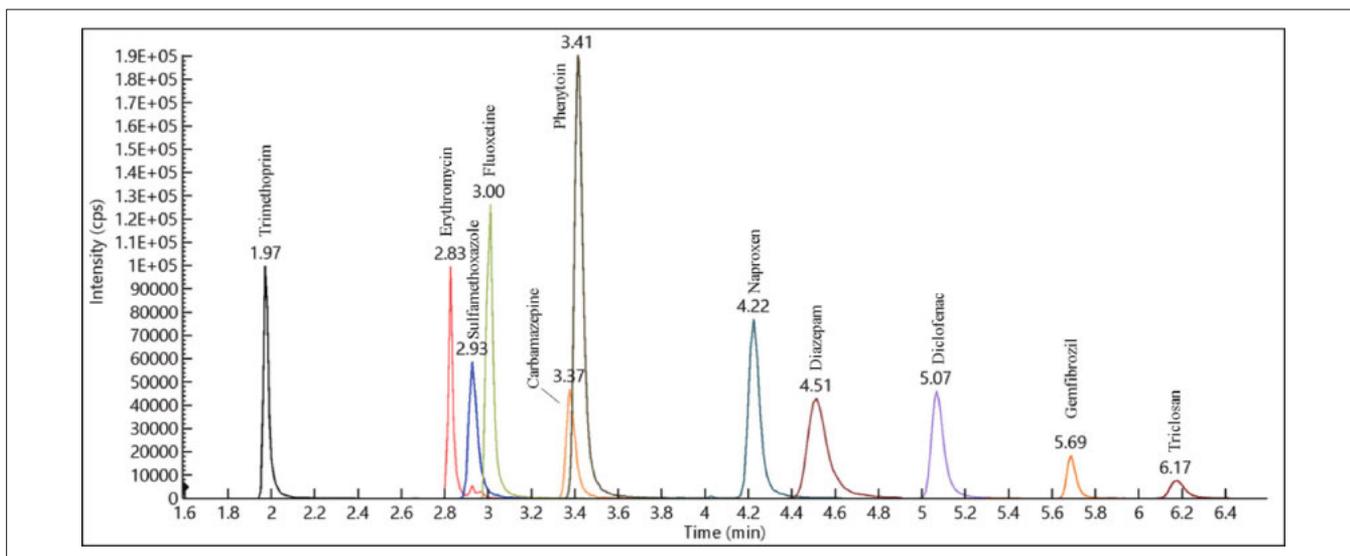


图 2. 显示 250 ppt PPCP 标准混合物色谱分离的叠加 MRM 色谱图。

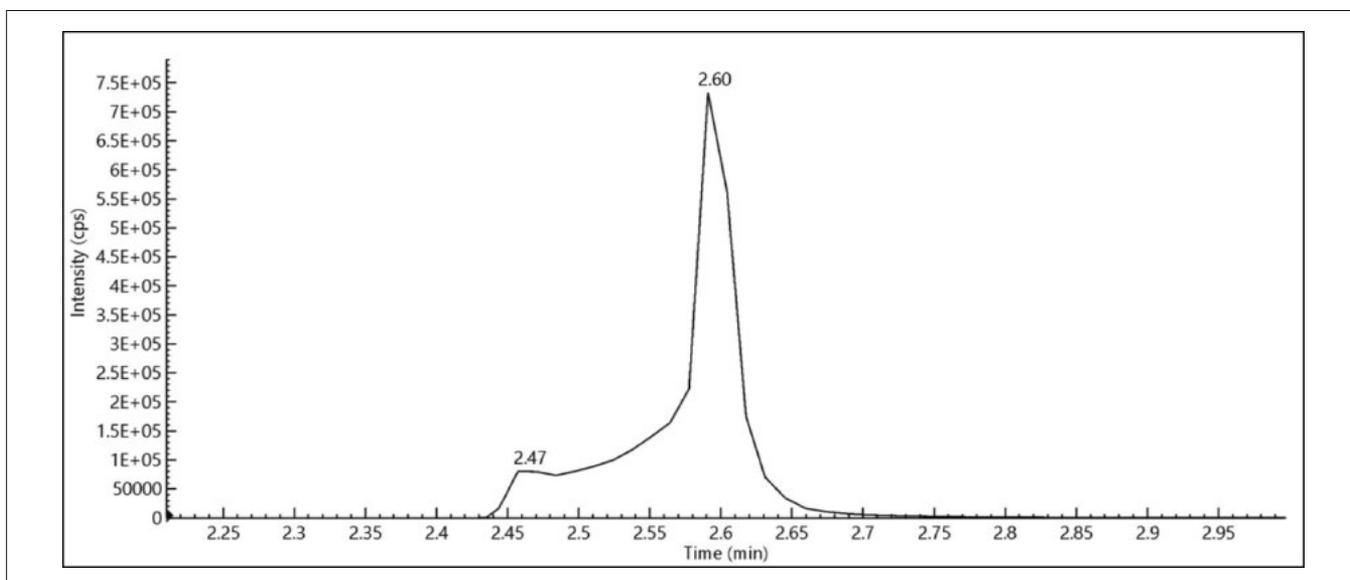


图 3. 浓度为 250 ppt 的依那普利的 MRM 色谱图。

从图 3 中可以看出，依那普利呈现为宽的、不均匀的峰。依那普利以顺式和反式异构体的混合物形式存在。⁶非高斯峰形状是由于溶液中异构体之间构象转变缓慢所致。⁶由于其信号强度高，图 2 没有显示依那普利完整峰形，以便更好地显示其他 11 种分析物的分离。

根据图 4，发现即使在低浓度水平上，色谱重复性表现也是非常不错的（50 ppt 标准混合物 10 针重复性叠加色谱图）。

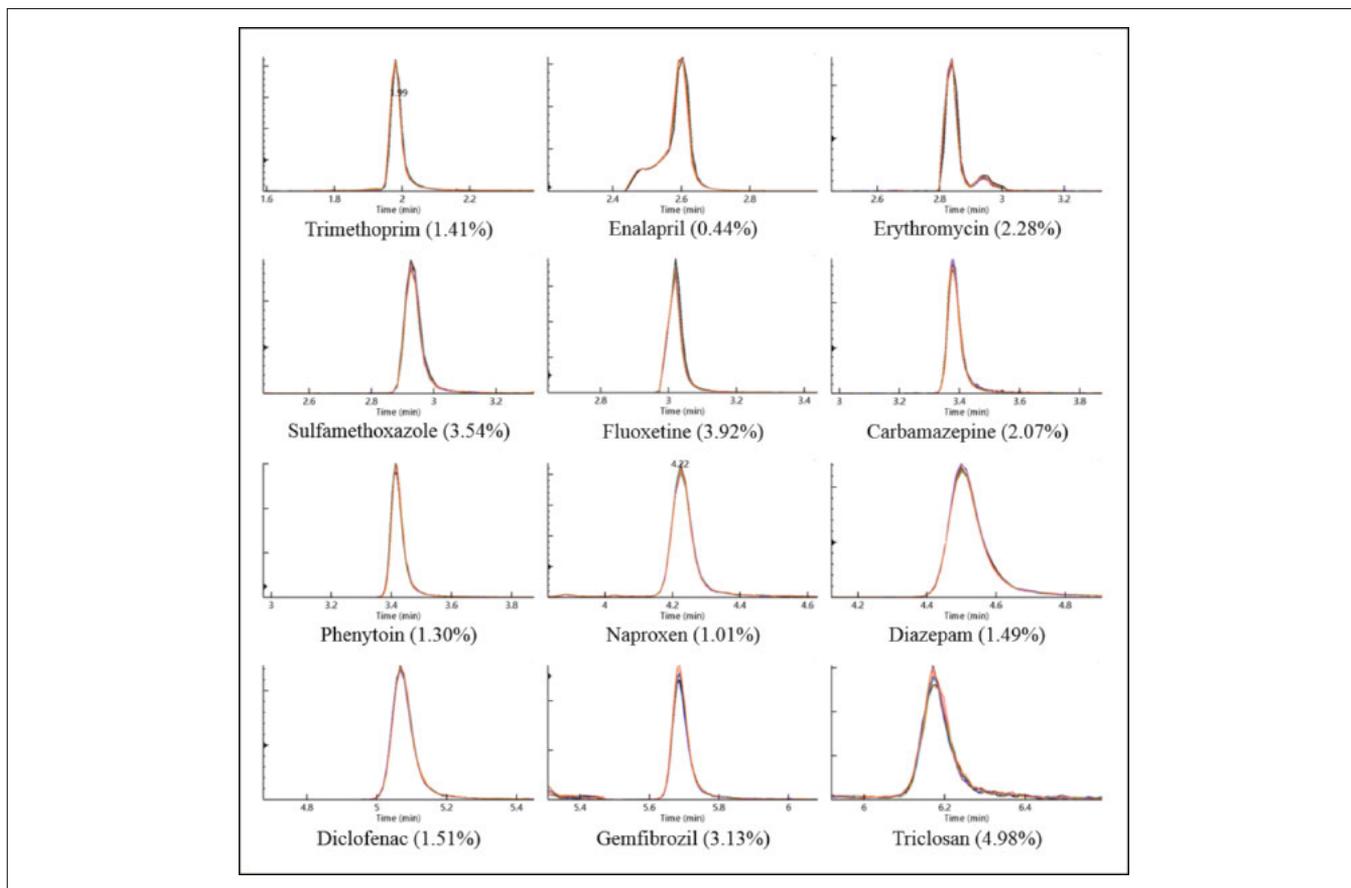


图 4. 10 次 50 ppt PPCP 标准混合物重复进样与峰面积 %RSDs 的重叠。

图 5 显示了选定的 PPCP 的线性，其中所有分析物的 R² 值均高于 0.99。

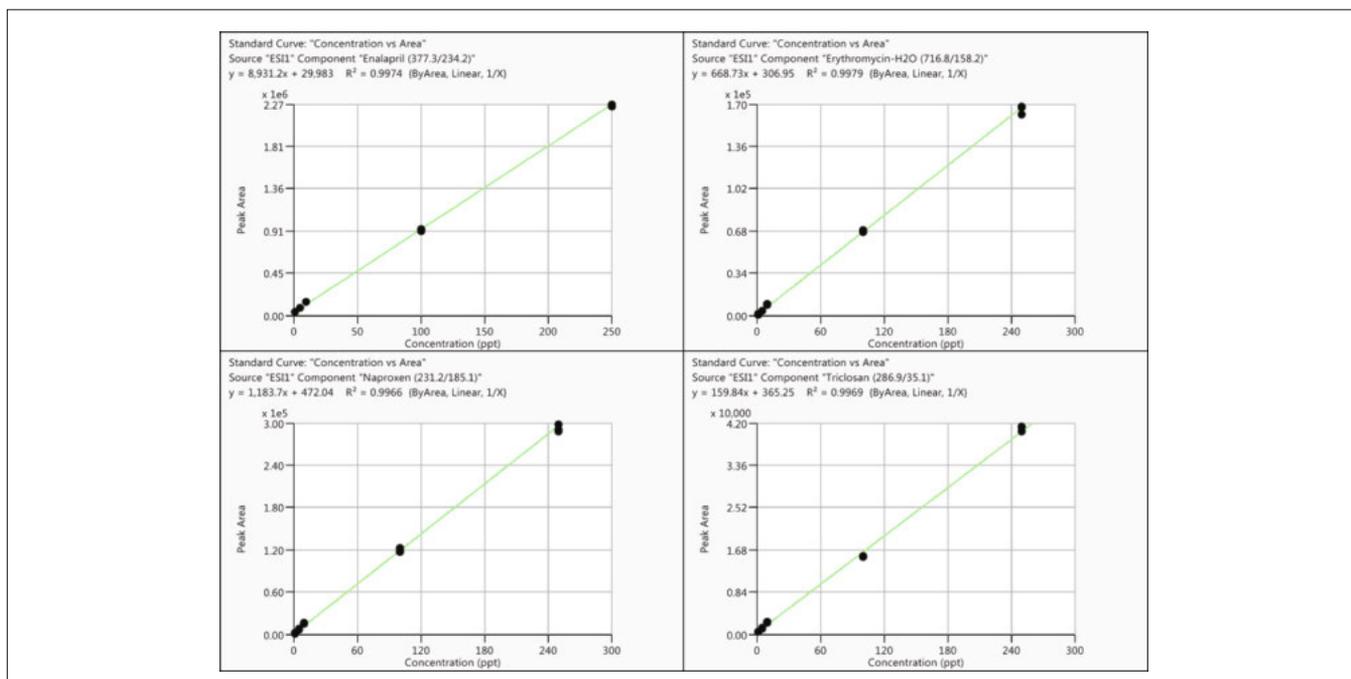


图 5. 依那普利、红霉素、萘普生和三氯生的线性。

如表 5 中所列，基于它们的 Level 1 校准标准响应，确定每种分析物的定量限（LOQ）。

表 5. 分析物定量限。

分析物	定量限计算值 (ppt)
甲氧苄氨嘧啶	0.17
依那普利	0.01
红霉素	0.42
磺胺甲恶唑	1.02
氟苯氧丙胺	0.08
酰胺咪嗪	0.39
苯妥英	0.13
萘普生	0.54
安定	0.22
双氯芬酸	0.09
二甲苯氧庚酸	0.25
三氯生	0.57

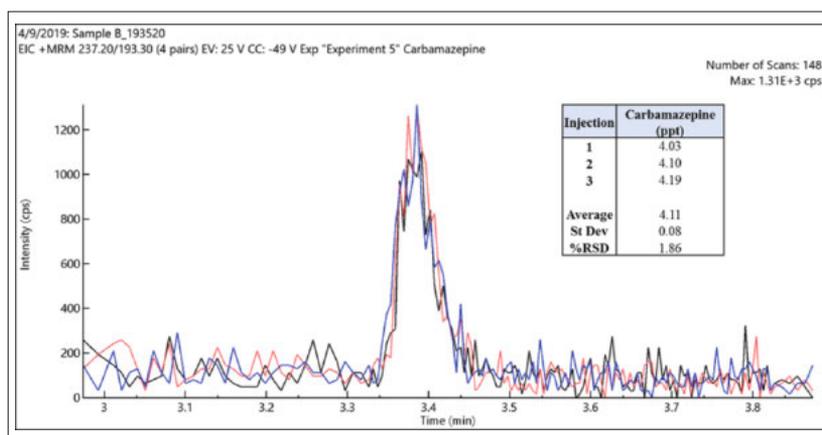


图 6. 显示酰胺咪嗪的自来水 #2 三次进样的重叠 MRM 色谱图（未经平滑处理）。

用于分析的样品包括来自不同来源的两份自来水样品，以及来自三个不同瓶装水品牌的样品。在这些样品中，仅发现自来水 #2 中含有待测分析物。酰胺咪嗪是一种用于预防和控制癫痫发作的抗癫痫药物，在自来水 #2 中测得的浓度为 4.11 ppt（图 6）。

结论

- 本研究使用与 QSight 220 串联质谱检测器联用的 PerkinElmer QSight SP50 在线固相萃取系统有效且稳定地完成 PPCP 在线固相萃取进样、色谱分离和定量。
- 由于独特的大容量固相萃取柱和高浓缩率，本方法不需要使用大量样品，从而节省时间、提高效率、减少实验室浪费。
- 由于 Simplicity 3Q 软件在线固相萃取 / 色谱分析过程中自动为进样做好准备，因此在线固相萃取法仅将每个样品的分析时间延长了 6.5 分钟。
- 作为固相萃取前处理阶段的一部分，该程序能够减小溶剂消耗量（每个样品 ≤ 10 mL）。
- 该方法提供了出色的在线样品前处理 / 预富集和色谱重复性，并且允许大部分分析物的 LOQ 低于 1 ppt。
- 使用本文描述的方法 / 程序，以及很好地完成监测饮用水中低浓度 PPCP 的基本任务。

参考文献

1. A.J. Ebele, et al., Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment, *Emerging Contaminants* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>.
2. G. Eckstein, Emerging EPA Regulation of Pharmaceuticals in the Environment, *Environmental Law Reporter* 2012, 42, 11105 – 11108.
3. M.A. Mottaleb et al., Emerging Micro-Pollutants Pharmaceuticals and Personal Care Productions (PPCPs) Contamination Concerns in Aquatic Organisms – LC/MS and GC/MS Analysis. In *Emerging Micro-Pollutants in the Environment: Occurrence, Fate, and Distribution*; Mitchell, et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2015.
4. 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).
5. Daughton, C.G., *Environ. Impact Assess. Rev.* 24 (2004) 711.
6. EPA Method 542: Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC/ESI-MS/MS), September 2016, EPA-815-R-15-012.
7. EPA Method 1694: Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS, December 2007, EPA-821-R-08-002.