

利用固相萃取和液相色谱/质谱/质谱在正负离子模式下检测水中的医药类化合物

应用文摘

环境分析

作者

Chin-Kai Meng
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

Stephen L. Werner and Edward T. Furlong
National Water Quality Laboratory
U.S. Geological Survey
PO Box 25046, MS 407, Building 95, Denver Federal Center
Denver, CO 80225
USA

摘要

使用固相萃取技术和液相色谱/质谱/质谱技术，分别对19个（正离子模式）和11个（负离子模式）医药类化合物进行了分析，检测灵敏度可低至皮克，无需进行衍生化。在1皮克至1纳克的柱上进样量的范围内，表现出极好的线性。

柱上进样量为5皮克的条件下，六次进样的精密度（平均标准偏差）小于15%，只有复西汀是例外，为23%。

前言

多个著名的医学杂志和报纸的许多文章都报导了人类和动物的性发展动态和生殖健康问题，例如精子数量少，生殖器畸形，雄性鱼产卵等等。科学家提到，人造的化学品（例如农药和医学药品）都在扰乱生物的内分泌系统。

诸如抗生素、非处方药和咖啡因等化合物从下水道大量地被冲入河流，甚至少量的化合物还进入了饮用水系统。为了监测地表水和地下水中的微量药物化合物，需要建立有效的样品制备和分析方法。

在1999年，美国地质调查局国家水质量实验室开发了相应的分析方法，利用OASIS HLB固相萃取净化，高效液相色谱-质谱技术来分析这些化合物。

使用多反应监测（MRM）技术，可以将来自水中的杂质和基质干扰信号降至最低，从而提高信噪比，最后获得目标化合物的最佳定量分析结果。在本应用文摘中，利用固相萃取技术，液相色谱/质谱/质谱分析19个药物化合物（在正离子模式）和11个药物化合物（在负离子模式）。



实验部分

样品制备步骤

更详细的信息可以参见参考文献1。

1. 利用0.7- μm 的玻璃纤维过滤器在现场或是实验室将采来的水过滤。
2. 抽取1升经过过滤的水，以10ml/min的流速通过固相萃取柱，固相萃取柱的填料数量是0.5克。
3. 用6毫升的甲醇洗脱固相萃取柱，然后再用4毫升0.1%三氟乙酸的甲醇溶液洗脱。

4. 洗脱液浓缩至100微升

5. 加入内标 (ISTD)。萃取物最后被定容至1毫升。

校正标样

对于正离子模式，准备9点校正：1、5、10、20、40、100、200、400和1000pg/ μL 。对于负离子模式，准备6点校正：10、20、40、80、400和800pg/ μL 。

仪器

正离子模式

液相色谱:	1200 液相色谱										
色谱柱:	ZORBAX Extend-C-18, RRHT, 2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm										
柱温:	40 $^{\circ}\text{C}$										
流动相:	A: 0.1%甲酸水溶液, 用氨水将pH值调至5.5 B: 乙腈										
流速:	0.3 mL/min										
梯度:	<table><thead><tr><th>时间</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>15</td><td>100</td></tr><tr><td>20</td><td>100</td></tr><tr><td>21.5</td><td>0</td></tr></tbody></table>	时间	%B	0	0	15	100	20	100	21.5	0
时间	%B										
0	0										
15	100										
20	100										
21.5	0										
进样体积:	1.0微升										
质谱:	G6410A QQQ										
离子化模式:	ESI-(+)										
扫描范围:	125 to 800 amu										
扫描时间:	300毫秒										
毛细管电压:	3500 V										
雾化器压力:	40 psi										
干燥气流速:	9 L/min										
干燥气温度:	350 $^{\circ}\text{C}$										
锥孔电压:	35伏										

负离子模式

液相色谱:	1200 液相色谱																
色谱柱:	ZORBAX Extend-C-18, RRHT, 2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm																
柱温:	60 $^{\circ}\text{C}$																
流动相:	A: 0.04%乙酸水溶液 B: 乙腈																
流速:	0.3 mL/min																
梯度:	<table><thead><tr><th>时间</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>0</td></tr><tr><td>1</td><td>40</td></tr><tr><td>2</td><td>52</td></tr><tr><td>3</td><td>70</td></tr><tr><td>6</td><td>100</td></tr><tr><td>13</td><td>100</td></tr><tr><td>14</td><td>0</td></tr></tbody></table>	时间	%B	0	0	1	40	2	52	3	70	6	100	13	100	14	0
时间	%B																
0	0																
1	40																
2	52																
3	70																
6	100																
13	100																
14	0																
进样体积:	1.0微升																
质谱:	G6410A QQQ																
离子化模式:	ESI(-)																
扫描范围:	120-800 amu																
扫描时间:	300毫秒																
毛细管电压:	3500 V																
雾化器压力:	40 psi																
干燥气流速:	9 L/min																
干燥气温度:	200 $^{\circ}\text{C}$																
锥孔电压:	35伏																

正负离子模式的多反应监测参数见表1和2。

表1. 正离子下的多反应监测的参数

化合物名	保留时间	分子量	母离子	定量离子	碰撞能量	驻留时间	分组
甲福明二甲双胍盐酸盐	0.856	129	130.4	71.5	15	300	1
对乙酰氨基酚	4.591	151	152.3	110.3	18	30	2
舒喘宁	4.717	239	240.4	148.4	15	30	2
甲氧咪胍	4.815	252	253.4	94.9	17	30	2
1, 7-二甲基黄嘌呤	4.89	180	181.3	123.9	20	30	2
可铁宁	5.24	176	177.3	118.3	29	30	2
可待因	5.321	299	300.4	164.9	30	30	2
咖啡因	5.493	194	195.3	137.9	22	30	2
甲氧苄氨嘧啶	5.935	290	291.4	122.8	25	30	2
塞苯哒唑	7.194	201	202.3	131.3	35	100	3
磺胺甲基异噁唑	7.309	253	254.3	156.0	15	100	3
阿奇霉素	7.326	749	375.5	157.9	16	100	3
苯海拉明	8.446	255	256.5	167.1	5	100	4
盐酸地尔硫草	8.693	414	415.4	177.6	18	100	4
卡马西平	8.912	236	237.4	194.0	20	100	4
氟西汀盐酸盐	9.71	309	310.4	148.5	0	100	5
去羟尼非地平	10.635	344	345.4	283.9	27	100	5
杀鼠灵	11.152	308	309.4	163.3	15	100	5
霉康唑	12.865	416	417.2	159.3	30	300	6

表2. 负离子下的多反应监测的参数

化合物名	保留时间	分子量	母离子	定量离子	碰撞电压	碰撞能量	驻留时间	分组
二氢氯噻	3.42	297	296	269	140	20	70	1
阿司匹林	3.49	180	179	122	120	15	70	1
依那普利拉	3.71	348	347	114	120	10	70	1
速尿灵	4.51	330	329	285	140	15	70	1
酮洛芬	5.17	254	253	209	80	5	70	2
降固醇酸	5.20	214	213	127	80	10	70	2
萘普生	5.20	230	229	170	80	10	70	2
双氯芬酸钠盐	5.84	294	294	250	100	10	100	3
布洛芬	6.03	206	205	161	80	0	100	3
布洛芬-d3	6.03	209	208	164	80	0	100	3
吉非贝齐	6.49	250	249	121	120	25	150	4
三氯二苯脲	6.66	314	313	160	140	15	150	4

结果与讨论

图1显示了负离子模式下的总离子流图。负离子模式下，11个化合物的分析时间小于7分钟。使用1.8微米的色谱柱，峰宽一般在0.1分钟。相对于3.5微米或更大粒径的色谱柱，其色谱峰更窄，信噪比更高。

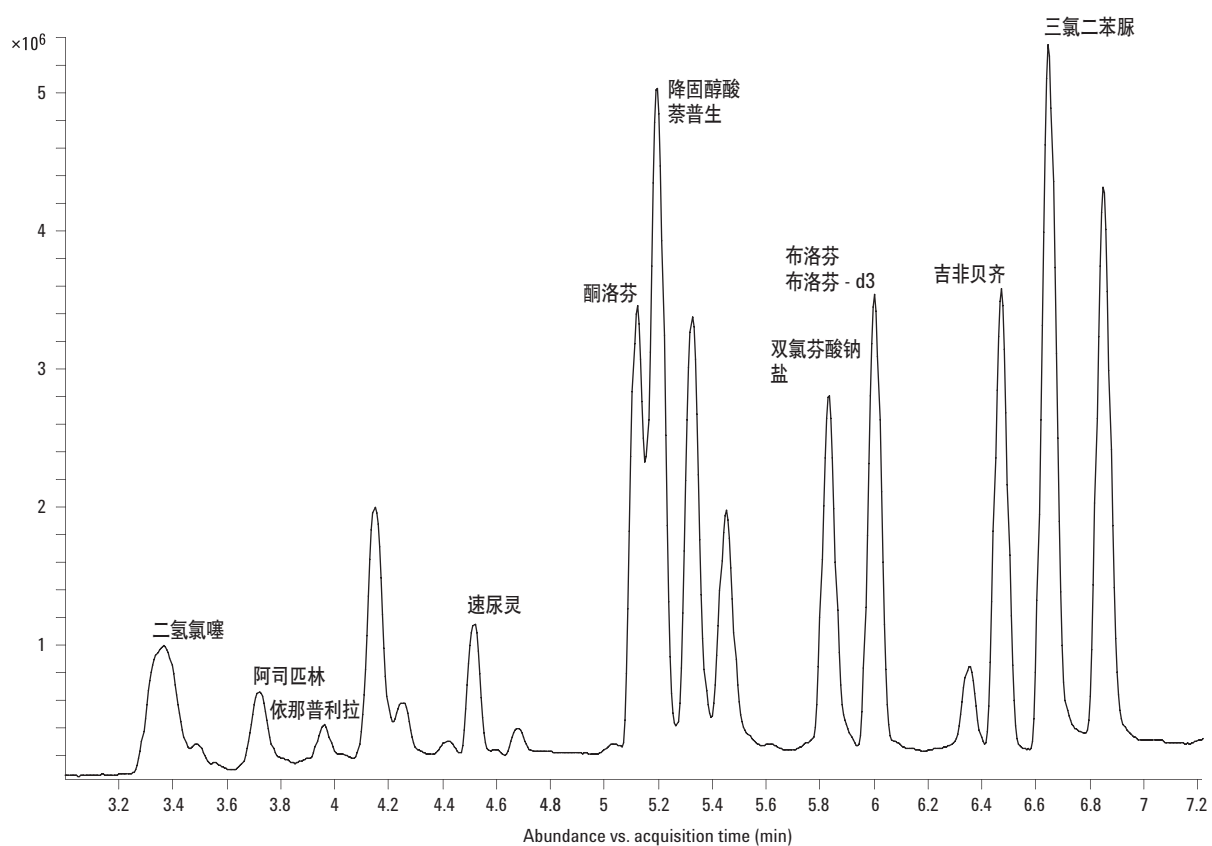


图1. 11个化合物的负离子模式下的总离子流图

如图 2 所示，某些化合物，如酮洛芬对干燥气的温度很敏感。温度（350 °C）越高，母离子响应强度越低。所以，在负离子模式下，干燥气的温度设置为200 °C。

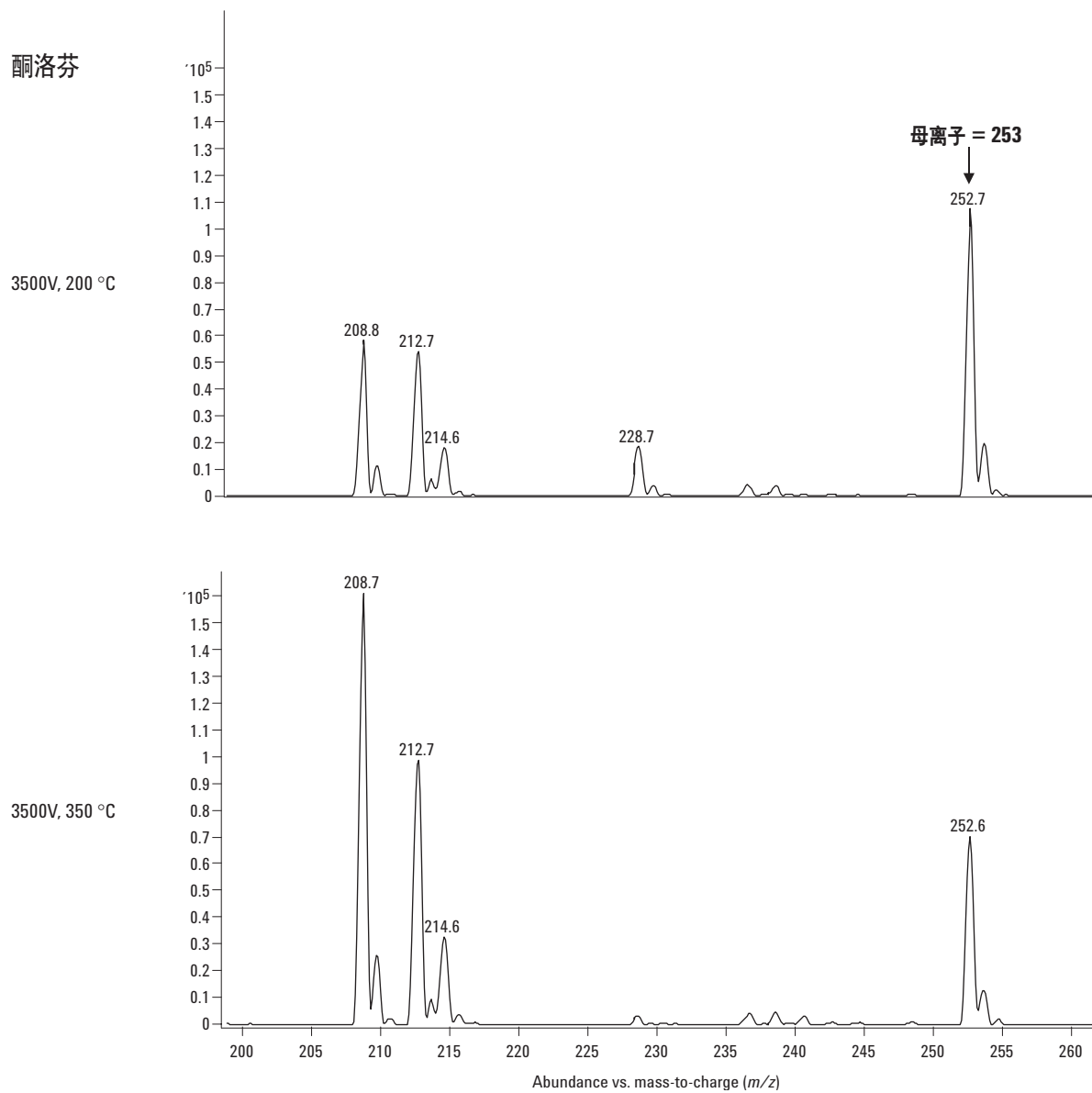


图2. 更高的干燥气温度会降低某些化合物母离子的响应

在图3中，发现子离子碎片的质荷比大于母离子。对于阿奇霉素，由于二价离子的响应高于一价离子，因此被选为母离子。因此，根据母离子的选择，有时候子离子的质荷比可以大于母离子，所以扫描范围需要更高一些。

图4为，每个化合物的柱上进样量为5皮克时，19个化合物的正离子模式多反应监测离子流图的叠加图。

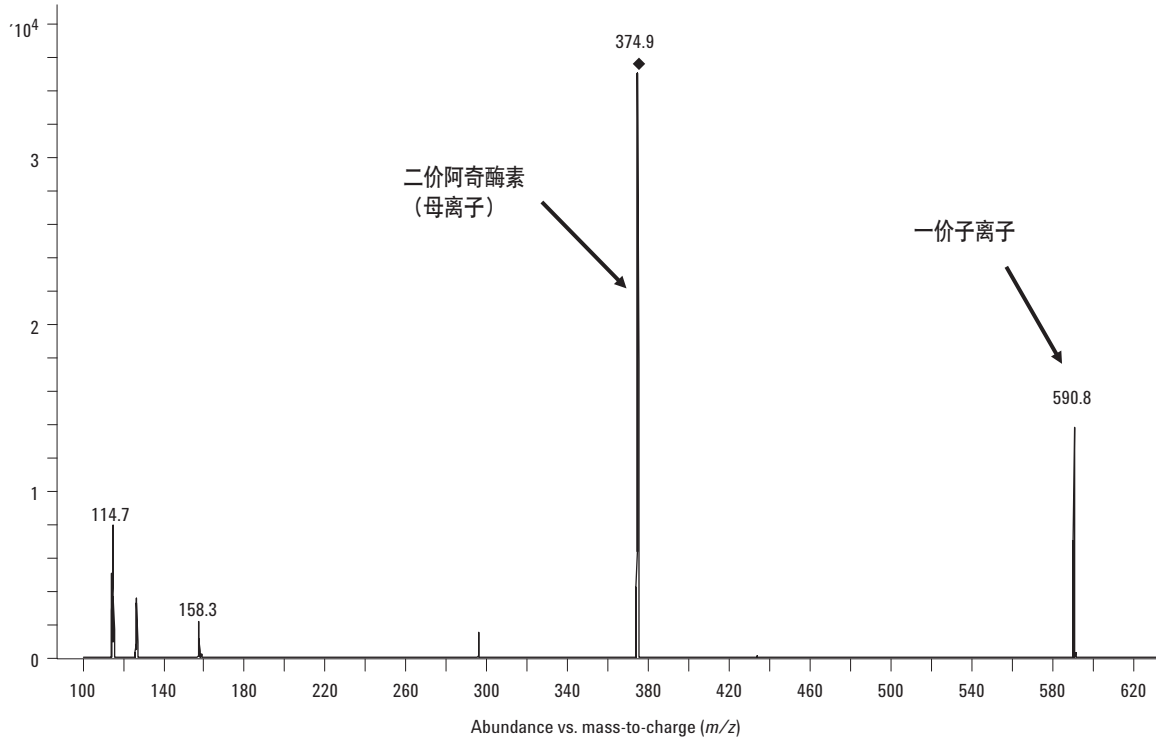


图3. 在较大的质荷比下，二价母离子转变成成为子离子

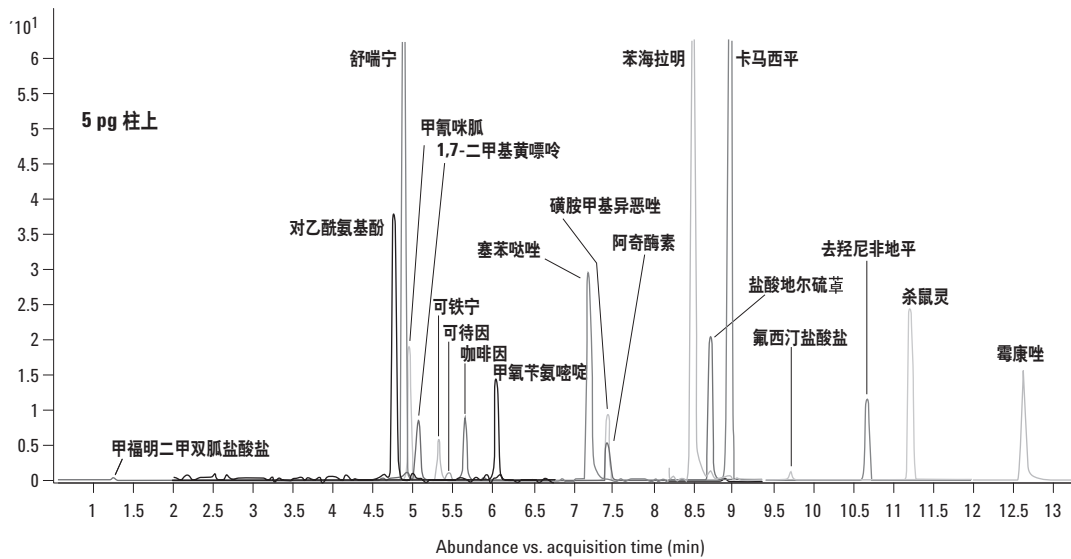


图4. 在正离子模式下，19个化合物的多反应监测离子流图的叠加图

图5为在负离子模式下，柱上进样量为10皮克时的10个药物化合物的多反应监测离子流图的叠加图。在图4和5中，分析时间相对变短，信噪比提高。

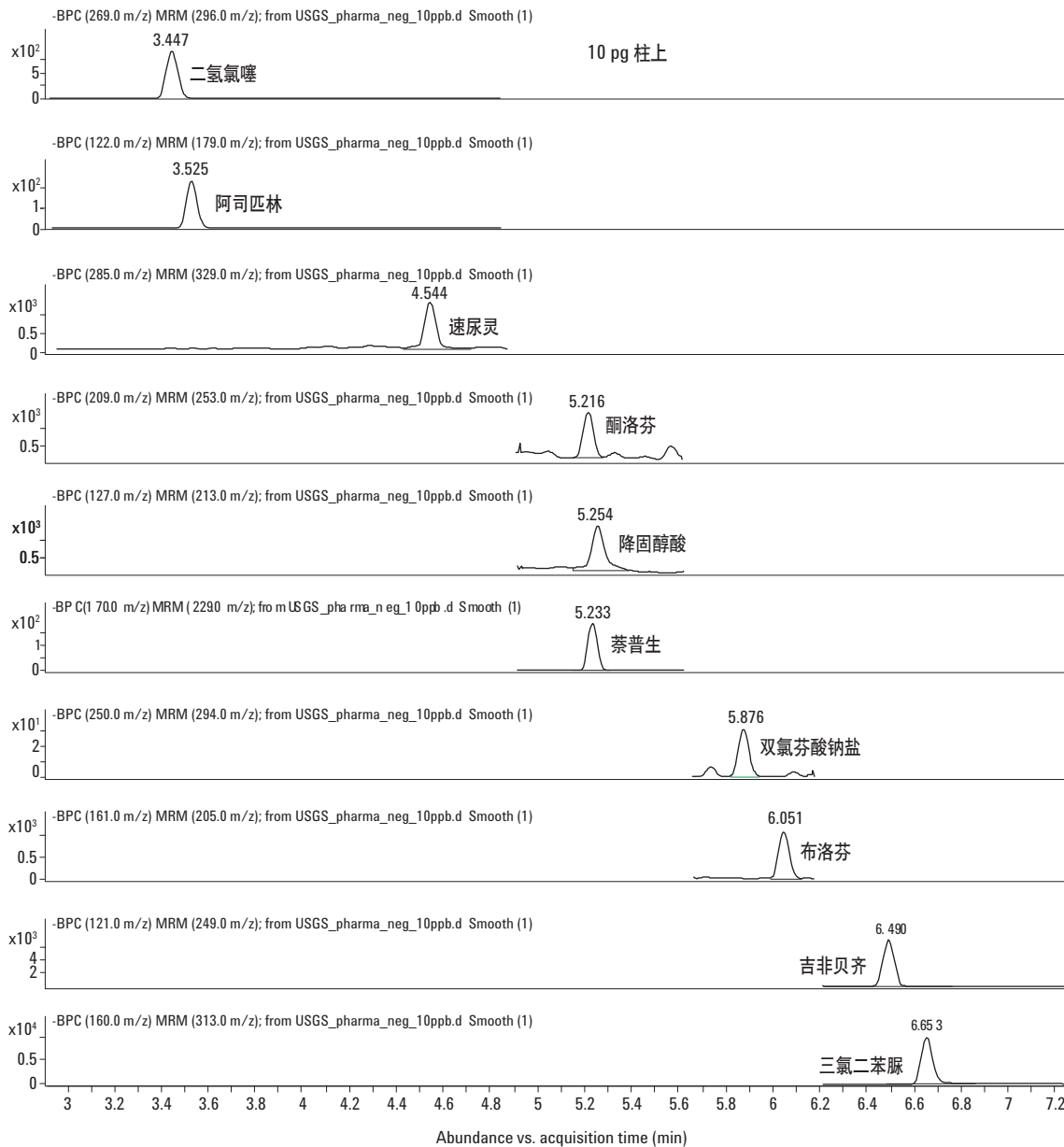


图5. 在负离子模式下，10个化合物的多反应监测离子流图的重叠图

表3列出了19个化合物（ESI正离子模式）在浓度范围是1、5、10、20、40、100、200、400和1000 pg的线性曲线。采用两种校正模式，线性和二次方程模式，两种模式都采用过原点及无权重计算。某些化合物的拟和度从线性模式到二次方程模式有了明显的改进。这是化合物的特性所决定的。

表3. 1、5、10、20、40、100、200、400和1,000 pg的线性度 (ESI+). 过原点, 无权重

化合物	R ² (线性)	R ² (二次方程)
甲福明二甲双胍盐酸盐	0.9975	0.9999
1, 7-二甲基黄嘌呤	0.9998	0.9998
对乙酰氨基酚	0.9852	0.9999
咖啡因	0.9992	0.9997
甲氟咪胍	0.9968	0.9998
可待因	0.9989	0.9997
可铁宁	0.9971	0.9998
舒喘宁	0.9850	0.9994
甲氧苄氨嘧啶	0.9980	0.9999
阿奇霉素	0.9633	0.9998
磺胺甲基异噁唑	0.9998	0.9999
塞苯哒唑	0.9997	0.9998
卡马西平	0.9926	0.9999
盐酸地尔硫革	0.9997	0.9997
苯海拉明	0.9975	0.9998
去羟尼非地平	0.9985	0.9993
氟西汀烟酸盐	0.9984	0.9997
杀鼠灵	0.9989	0.9997
霉康唑硝酸盐	0.9989	0.9995

表4显示了每个分析化合物的柱上进样量约为5皮克时，六次进样分析的精密密度数据。除了氟西汀（精密度的平均偏差是23%），所有的化合物的分析结果精密密度都小于15%。

**表4. 每个化合物的浓度是5 pg/μL (柱上进样量是5 pg), ESI(+)
的六次分析结果的精密密度**

化合物	%RSD
甲福明二甲双胍盐酸盐	12.4
1, 7-二甲基黄嘌呤	8.6
对乙酰氨基酚	6.1
咖啡因	5.7
甲氟咪胍	4.1
可待因	16.2
可铁宁	10.5
舒喘宁	3.7
甲氧苄氨嘧啶	3.6
阿奇霉素	9.4
磺胺甲基异噁唑	10.7
塞苯哒唑	5.3
卡马西平	2.8
盐酸地尔硫革	4.7
苯海拉明	3.7
去羟尼非地平	5.4
氟西汀烟酸盐	23.4
杀鼠灵	4.4
霉康唑硝酸盐	2.9

表5列出了在电喷雾负离子模式下，11个药物的线性度（样品浓度范围是，10、20、40、80、400和800pg的柱上进样量）。除了三氯二苯脲之外（R2是0.97），所有的R2值都大于0.99。

表5. 在电喷雾负离子模式下，11个药物在浓度范围是10、20、40、80、400和800pg的柱上进样量时的线性结果（包括原点）

化合物名	R ² (线性)
二氢氯噻	0.9999
阿司匹林	0.9977
依那普利拉	0.9981
速尿灵	0.9997
酮洛芬	0.9988
降固醇酸	0.9997
萘普生	0.9994
双氯芬酸钠盐	0.9993
布洛芬	0.9997
布洛芬-d3	0.9998
吉非贝齐	0.9993
三氯二苯脲	0.9655

当分析方法建立完成之后，就可以进行环境样品中目标化合物的筛选和定量分析。图6、7、8是水样在正离子和负离子模式下，多反应监测分析结果。

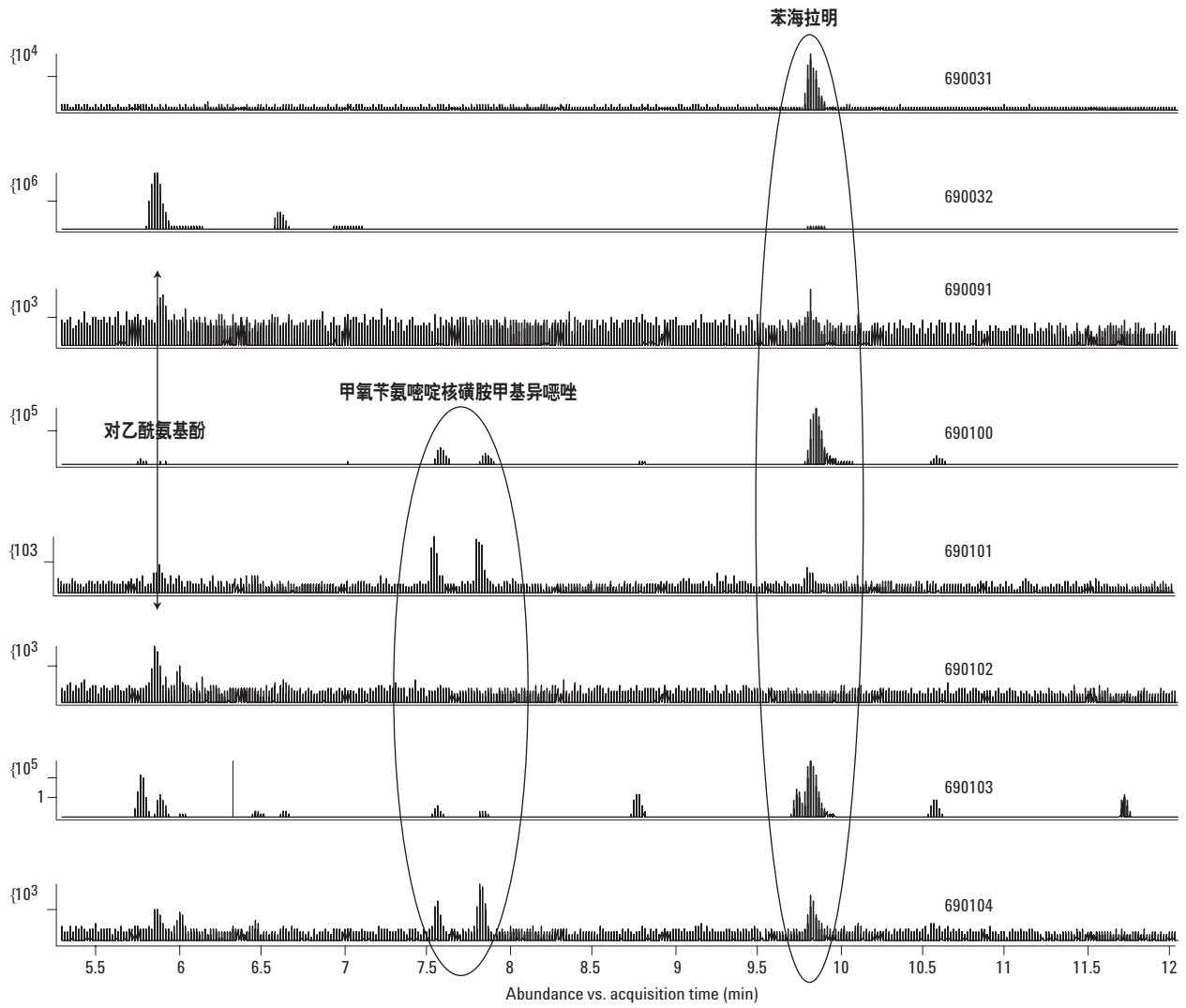


图6. 在正离子模式下药物筛选的分析结果

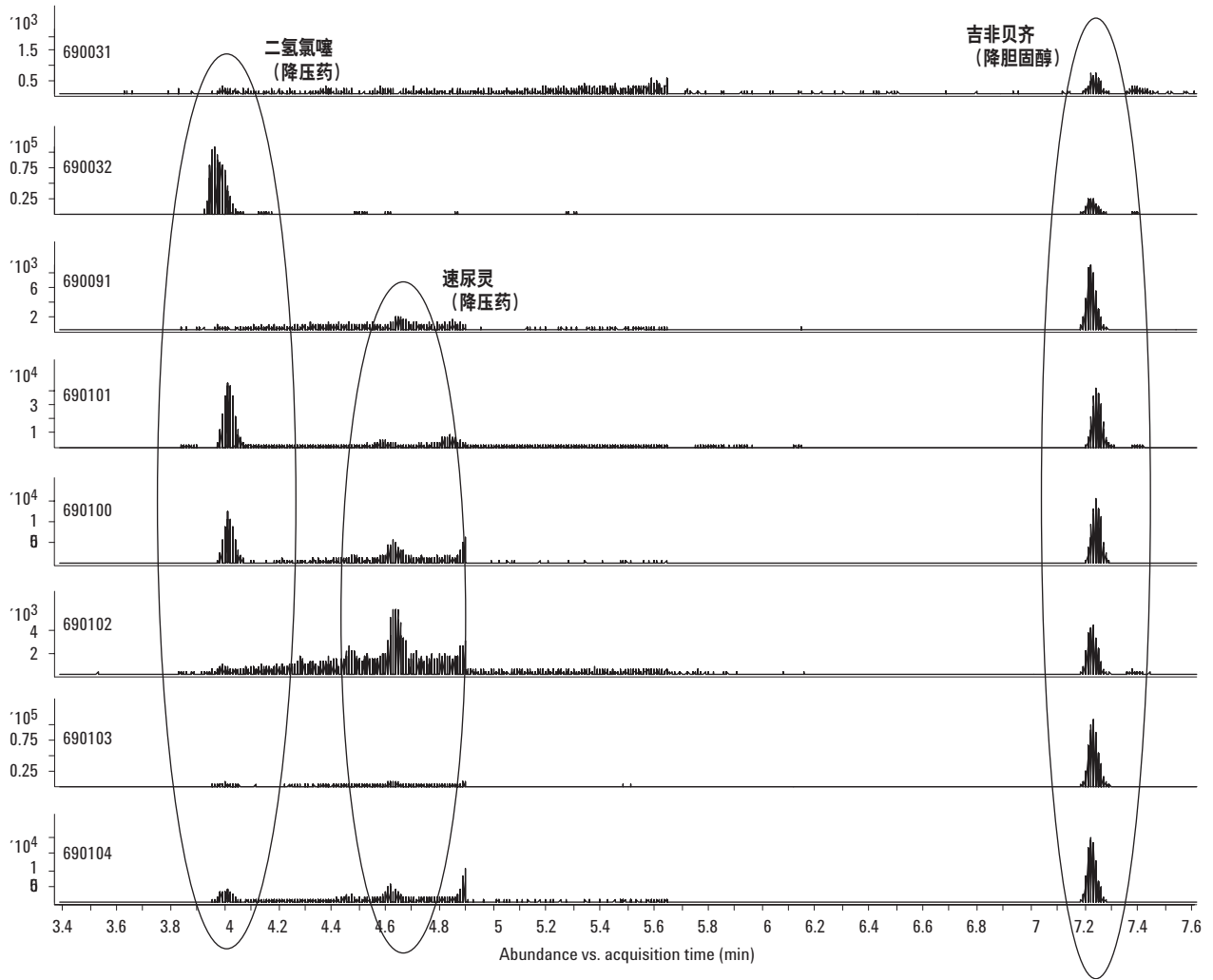


图7. 在负离子模式下，药物的筛选结果

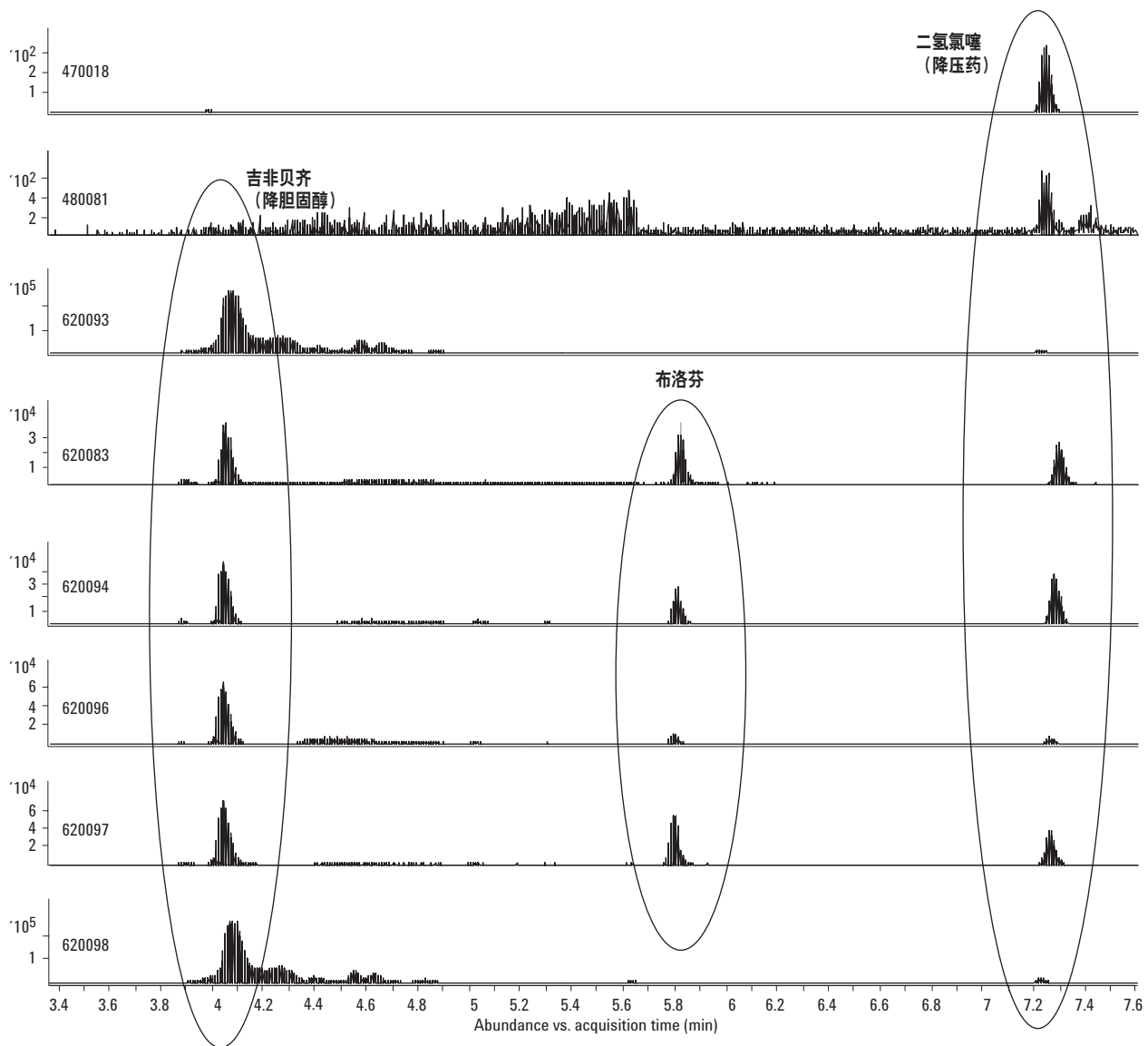


图8. 在负离子模式下，药物的筛选结果

图6的分析结果表明，水样中检出如苯海拉明和对乙酰氨基酚。这两个化合物对于几个水样都很常见。另外，还检出一些抗生素化合物。更有趣的是，在图7和8所示的结果中，还检出与高血压和胆固醇的治疗药物。

结论

使用固相萃取和液相色谱/质谱/质谱技术，分析了正离子模式下19个化合物，负离子模式下11个化合物，灵敏度可到皮克水平，而且无需衍生化。在1皮克到1纳克的浓度范围内，具有很好的线性度。

在5皮克浓度下（柱上样品量），六次进样的精密度（%RSD）都在15%之内，只有氟西汀在23%

本方法可以用于水样品中常见药物的筛选和定量分析。

参考文献

1. USGS SOP: Instrumental Analysis for Determination of Human Health Pharmaceuticals in Water by Chemically Modified Styrene-Divinylbenzene Resin-Based Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, by Steve Werner, 2006.

更多的信息

如需了解我们产品和服务更多的信息，请浏览我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对使用本材料引起事故或有关损害不负责任。

本出版物的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技版权所有。2006

中国印刷

2006年7月25日

5989-5319CHCN



Agilent Technologies