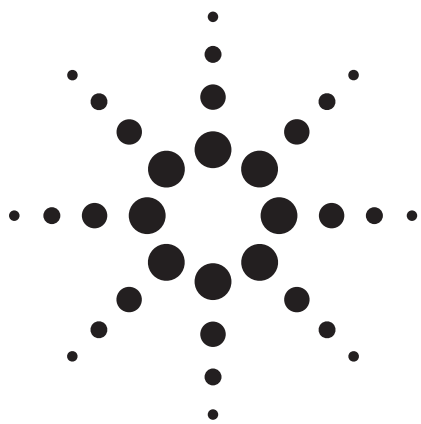




EPA 方法 1694：使用 HPLC/MS/MS 检测水、土壤、沉积物和生物固体中的药物和个人护理用品的 Agilent 6410A LC/MS/MS 解决方案

应用报告

环境分析

作者

Imma Ferrer and E. Michael Thurman
Center for Environmental Mass
Spectrometry
University of Colorado
Civil, Environmental, and Architectural
Engineering
ECOT 441, 428 UCB
Boulder, CO 80309
USA (美国)

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA (美国)

摘要

使用 Agilent G6410A 三重串联四极杆质谱仪 (QQQ) 建立了水样中 65 种药物的筛选和确认方法。该方法按照美国国家环保局 (EPA) 1694 号方法指南进行开发。根据不同药物的极性和提取方式，使用了 4 种不同的色谱梯度和液相色谱条件。应用了正、负两种模式的电喷雾电离和两种裂解转变的多反应监测分析 (MRM) (每个化合物有一个定量离子和一个定性离子)，这使得本方法比 EPA 方法拥有更多的结构确证信息。所有药物的响应值在三个数量级范围具有很好的线性 ($r^2 > 0.99$)。为评价本方法的分析性能，对从 Boulder Creek (Colorado) 采集的污水样品进行了实样分析，在该样品中检出了卡马西平和苯海拉明。



Agilent Technologies

引言

近 20 年来，一项挑战性的分析任务——检测环境中出现的污染物，已经成为科学家们的重要研究目标之一。药物和个人护理用品（PPCPs）是污染物中一组重要的检测目标，近十年来尤其如此。在个人护理用品检测领域，已经研发出一系列有关此类物质的分析方法，包括最近发布的 EPA 方法 1694（2007 年 12 月）[1]。EPA 的这种方法使用固相萃取（SPE）进样水样的制备[1]。所得提取物直接用串联质谱仪分析，每种化合物用到一种裂解转变。本应用报告阐述了应用这种方法的安捷伦解决方案，通过

Agilent 6410A LC/MS 三重串联四极杆质谱仪得到了验证。安捷伦对 EPA 方法 1694 的初步应用涵盖了 PPCPs 混合物中的 65 种被分析物（总共 75 种被分析物）和 17 种标记内标物质（总共 20 种），每种化合物用一种 MRM 裂解转变进行分析。（说明：当时其他化合物和内标物质无法获得。）该方法中，使用 Agilent C-18 柱和 HILIC 柱（亲水性相互作用色谱柱）对所有化合物进行分析。为了得到更多的结构确证信息，对 65 种被分析物中的 60 种追加应用了第二种 MRM 裂解转变，由此得到的鉴定结果比 EPA 方法更有保证。本文中研究的药物名称见表 1。

表 1. 本文中研究的被分析物

EPA 1694 中的第 1 组化合物：46 种被分析物

对乙酰氨基酚	可待因	氟甲唑	青霉素 V	磺胺
氨苄青霉素	可天宁	氟西汀	罗红霉素	噻苯哒唑
阿奇霉素	脱氢硝苯地平	林可霉素	沙拉沙星	甲氧苄氨嘧啶
咖啡因	洋地黄毒苷	洛美沙星	磺胺氯吡嗪	泰乐菌素
卡巴多	地尔硫卓	咪康唑	磺胺嘧啶	维吉尼霉素
卡马西平	1,7-二甲基黄嘌呤	诺氟沙星	磺胺二甲氧嘧啶	地高辛 *
头孢噻肟	苯海拉明	氧氟沙星	磺胺甲基嘧啶	
环丙沙星	恩诺沙星	苯唑青霉素	磺胺二甲嘧啶	
克拉霉素	红霉素	噁唑酸	磺胺甲二唑	
邻氯青霉素	脱水红霉素	青霉素 G	磺胺甲恶唑	

* 化合物在当前条件下生成无法分析的钠加合物。

EPA 1694 中的第 2、3 和 4 组化合物：19 种被分析物

脱水四环素(2)	强力霉素(2)	二甲胺四环素(2)	三氯卡班(3)
			三氯生(3)
			华法林(3)
金霉素(2)	4-差向脱水四环素(2)	四环素(2)	沙丁胺醇(4)
		甲氧环素(2)	西咪替丁(4)
			二甲双胍(4)
去甲金霉素(2)	4-差向四环素(2)	吉非罗齐(3)	雷尼替丁(4)
		布洛芬(3)	
		萘普生(3)	

标记内标物质

¹³ C ₂ - ¹⁵ N-对乙酰氨基酚	¹³ C ₂ -红霉素	¹³ C ₆ -磺胺甲嘧啶	¹³ C ₃ -甲氧苄氨嘧啶
¹³ C ₃ -莠去津	氟西汀-d ₆	¹³ C ₆ -磺胺甲恶唑	华法令-d ₅
¹³ C ₃ -咖啡因	吉布罗齐-d ₆	¹³ C ₆ -2,4,5-三氯-苯氧基乙酸	卡马西平-d ₁₀ (不含于 EPA 清单)
¹³ C ₃ - ¹⁵ N-环丙沙星	¹³ C ₃ -布洛芬	¹³ C ₆ -三氯卡班	
可天宁-d ₃	¹³ C-萘普生-d ₃	¹³ C ₁₂ -三氯生	

实验部分

样品制备

药品标准品购自 Sigma (St. Louis, MO)。根据各种药物组分的溶解性，用纯乙腈或甲醇制得单一组分的药品贮备液，浓度约为 1,000 µg/mL，在-18 °C 保存。取这些贮备液，用乙腈和水稀释制成工作标准溶液。

水样从 Boulder Creek (Boulder, CO) 污水处理厂的排水口采得，并按 EPA 方法提取。安捷伦介绍过的一种具有亲水/亲脂性的 SPE 聚合吸附剂可能也适合于这种样品的提取。用“空白”污水提取物制备基质相同的标准溶液用于验证。在污水提取物加入混合药物标准溶液，制成不同浓度的加标溶液（浓度范围为 0.1 ~ 500 ng/mL 或 ppb），然后用 LC/MS/MS 分析。

LC/MS/MS 仪器条件

根据 EPA 的样品提取方法，将被分析物分组，各组的液相色谱分析分离条件如下：

第 1 组的液相色谱条件——酸性提取，电喷雾正离子化 (ESI+) 仪器条件

色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 × 100 mm, 3.5 µ (部件号 959793-902)
柱温	25 °C
流动相	乙腈-0.1% 的甲酸水溶液 (1:9)
流速	0.2–0.3 mL/min
梯度	t ₀ = 10% 乙腈, 0.2 mL/min t ₅ = 10% 乙腈, 0.2 mL/min t ₆ = 10% 乙腈, 0.3 mL/min t ₂₄ = 60% 乙腈, 0.3 mL/min t ₃₀ = 100% 乙腈
进样量	15 µL

第 2 组的液相色谱条件——酸性提取，电喷雾正离子化 (ESI+) 仪器条件

色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 × 100 mm, 3.5 µ (部件号 959793-902)
柱温	25 °C
流动相	乙腈-0.1% 的甲酸水溶液 (1:9)
流速	0.2 mL/min
梯度	t ₀ = 10% 乙腈 t ₁₀ = 10% 乙腈 t ₃₀ = 100% 乙腈
进样量	15 µL

第 3 组的液相色谱条件——酸性提取，电喷雾负离子化 (ESI-) 仪器条件

色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 × 100 mm, 3.5 µ (部件号 959793-902)
柱温	25 °C
流动相	甲醇-5 mM 醋酸铵水溶液 (4:6, pH 5.5)
流速	0.2 mL/min
梯度	t _{0.5} = 40% 甲醇 t ₇ = 100% 甲醇
进样量	15 µL

第 4 组的液相色谱条件——酸性提取，电喷雾负离子化 (ESI-) 仪器条件

色谱柱	Agilent ZORBAX HILIC Plus 2.1 × 100 mm, 3.5 µm (部件号 959793-901 自 2008 年 11 月 1 日起接受订购)
柱温	25 °C
流动相	乙腈-10 mM 醋酸铵水溶液 (98:2, pH 6.7)
流速	0.25 mL/min
梯度	t ₀ = 98% 乙腈 t ₅ = 70% 乙腈 t ₁₂ = 70% 乙腈
进样量	15 µL

所有各组通用的质谱条件如下：

Agilent G6410A 三重串联四极杆质谱仪的质谱条件

模式	电喷雾离子化器根据不同组别采用正离子模式或负离子模式
雾化器	40 psig
干燥气流速	9 L/min
毛细管电压	4000 V
干燥气温度	300 °C
碰撞诱导解离电压	70–130 V
碰撞能量	5–35 V
多反应监测分析（MRM）	每个化合物监测 2 种 transitions，见表 1
驻留时间	10 msec

结果与讨论

LC/MS/MS 条件优化

初步研究分两部分进行，第一部分对各种药物的碰撞诱导解离电压进行优化，以使前体离子产生最大的信号。通常选取质子化分子作为前体离子。使用一种自动程序（安捷伦科技公司的 MassHunter 优化软件）对每种化合物分别分析，检查各种电压下的裂解情况，根据数据选择最佳裂解信号。然后对各化合物再次进行自动测定，确定各种碰撞能量对定性、定量离子的影响。最佳碰撞能量在 5~35 V 之间。MRM transitions 和最佳碰撞能量见表 2A~2D。

表 2A. 第 1 组药物的 MRM transitions 和 MS 参数（标记内标物质以粗体字表示）

化合物	碰撞诱导解离电压	MRM transitions (<i>m/z</i>)	碰撞能量(eV)
对乙酰氨基酚	90	152 → 110 152 → 65	15 35
¹³C₂-¹⁵N-对乙酰氨基酚	90	155 → 111 155 → 93	15 25
氨苄青霉素	70	350 → 160 350 → 106	10 15
¹³C₃-莨菪去津	120	219 → 177 219 → 98	15 25
阿奇霉素	130	749.5 → 591.4 749.5 → 158	30 35
咖啡因	110	195 → 138 195 → 110	15 25
¹³C₃-咖啡因	110	198 → 140 198 → 112	15 25
卡巴多	80	263 → 231 263 → 130	5 35
卡马西平	110	237 → 194 237 → 179	15 35
卡马西平-d₁₀	110	247 → 204 247 → 202	15 35
头孢噻肟	90	456 → 396 456 → 324	5 5
环丙沙星	110	332 → 314 332 → 231	20 35
¹³C₃-¹⁵N-环丙沙星	110	336 → 318 336 → 235	15 35

表 2A. 第 1 组药物的 MRM transitions 和 MS 参数 (标记内标物质以粗体字表示) 续

化合物	碰撞诱导解离电压	MRM transitions (<i>m/z</i>)	碰撞能量(eV)
克拉霉素	110	748.5 → 158 748.5 → 590	25 15
邻氯霉素	90	436 → 160 436 → 277	15 15
可待因	130	300 → 215 300 → 165	25 35
可天宁	90	177 → 98 177 → 80	25 25
可天宁- d₃	90	180 → 80 180 → 101	25 25
脱氢硝苯地平	130	345 → 284 345 → 268	25 25
洋地黄毒苷	90	391 → 355 391 → 337	15 15
地高辛	钠加合物, 无响应		
地尔硫卓	130	415 → 178 415 → 150	25 25
1,7-二甲基黄嘌呤	90	181 → 124 181 → 99	15 15
苯海拉明	70	256 → 167 256 → 152	15 35
恩诺沙星	130	360 → 316 360 → 342	15 15
红霉素	90	734.5 → 158 734.5 → 576	35 15
¹³C₂-红霉素	90	736.5 → 160 736.5 → 578	25 15
脱水红霉素	90	716.5 → 158 716.5 → 116	25 25
氟甲唑	90	262 → 174 262 → 244	35 15
氟西汀	90	310 → 148	5
氟西汀- d₆	90	316 → 154	5
林可霉素	110	407 → 126 407 → 359	25 15
洛美沙星	130	352 → 308 352 → 265	15 25
咪康唑	90	415 → 159 415 → 69	35 25
诺氟沙星	70	320 → 302 320 → 276	15 15
氧氟沙星	110	362 → 318 362 → 261	15 25

表 2A. 第 1 组药物的 MRM transitions 和 MS 参数 (标记内标物质以粗体字表示) 续

化合物	碰撞诱导解离电压	MRM transitions (<i>m/z</i>)	碰撞能量(eV)
苯唑青霉素	70	402 → 160 402 → 243	15 5
噻唑酸	90	262 → 244 262 → 216	15 25
青霉素 G	90	335 → 160 335 → 176	5 5
青霉素 V	70	351 → 160 351 → 114	5 25
罗红霉素	130	837.5 → 679 837.5 → 158	15 35
沙拉沙星	130	386 → 299 386 → 368	25 25
磺胺氯吡嗪	90	285 → 156 285 → 92	10 25
磺胺嘧啶	110	251 → 156 251 → 92	15 25
磺胺二甲氧嘧啶	80	311 → 156 311 → 92	20 35
磺胺甲基嘧啶	110	265 → 156 265 → 92	15 25
磺胺二甲嘧啶	90	279 → 156 279 → 186	15 15
¹³ C ₆ -磺胺二甲嘧啶	90	285 → 186 285 → 162	25 25
磺胺甲二唑	80	271 → 156 271 → 92	10 25
磺胺甲恶唑	110	254 → 156 254 → 92	15 25
¹³ C ₆ -磺胺甲恶唑	110	260 → 162 260 → 98	15 25
磺胺	70	173 → 156 173 → 92	5 15
噻苯吡唑	130	202 → 175 202 → 131	25 35
¹³ C ₆ -2,4,5-三氯-苯氧基乙酸	110	259 → 201 259 → 165	5 25
甲氧苄氨嘧啶	110	291 → 230 291 → 261	25 25
¹³ C ₃ -甲氧苄氨嘧啶	110	294 → 233 294 → 264	25 25
泰乐菌素	110	916.5 → 174 916.5 → 772	35 35
维吉尼霉素	110	526 → 508 526 → 355	5 15

表 2B. 第 2 组药物的 MRM transitions 和 MS 参数

化合物	碰撞诱导解离电压	MRM transitions (m/z)	碰撞能量(eV)
脱水四环素	90	427 → 410 427 → 154	15 25
金霉素	110	479 → 462 479 → 197	15 35
去甲金霉素	130	465 → 430 465 → 448	25 15
强力霉素	110	445 → 428 445 → 154	15 25
4-差向脱水四环素 (EATC)	90	427 → 410 427 → 105	15 35
4-差向四环素 (ETC)	110	445 → 410 445 → 427	15 5
二甲胺四环素	90	458 → 441	15
四环素 (TC)	110	445 → 410 445 → 427	15 5

表 2C. 第 3 组药物的 MRM transitions 和 MS 参数

化合物	碰撞诱导解离电压	MRM transitions (m/z)	碰撞能量(eV)
吉非罗齐	100	249 → 121	5
吉非罗齐- d_6	100	255 → 121	5
布洛芬	75	205 → 161	5
$^{13}C_3$ -布洛芬	75	208 → 163	5
萘普生	75	229 → 169 229 → 170	25 5
^{13}C -萘普生- d_3	75	233 → 169 233 → 170	25 5
三氯卡班	100	313 → 160 313 → 126	10 25
$^{13}C_6$ -三氯卡班	90	319 → 160 319 → 132	5 25
三氯生	75	287 → 35	5
$^{13}C_{12}$ -三氯生	75	299 → 35	5
华法令	125	307 → 117 307 → 161	35 15
华法令- d_5	90	312 → 161 312 → 255	15 25

表 2D. 第 4 组药物的 MRM transitions 和 MS 参数

化合物	碰撞诱导解离电压	MRM transitions (m/z)	碰撞能量(eV)
沙丁胺醇	90	240 → 148	15
		240 → 166	5
西咪替丁	100	253 → 159	10
		253 → 95	25
二甲双胍	80	130 → 60	10
		130 → 71	25
雷尼替丁	110	315 → 176	15
		315 → 130	25

分别对各组化合物进行色谱分离，且每个 MRM transitions 的驻留时间为 10 毫秒。图 1A~1D 为所有药物标准品的相应色谱图（柱上浓度 100 ppb）。根据各个目标分析物相应的质子化分子及碎片离子的 MRM transitions 分别得到了提取离子色谱图。

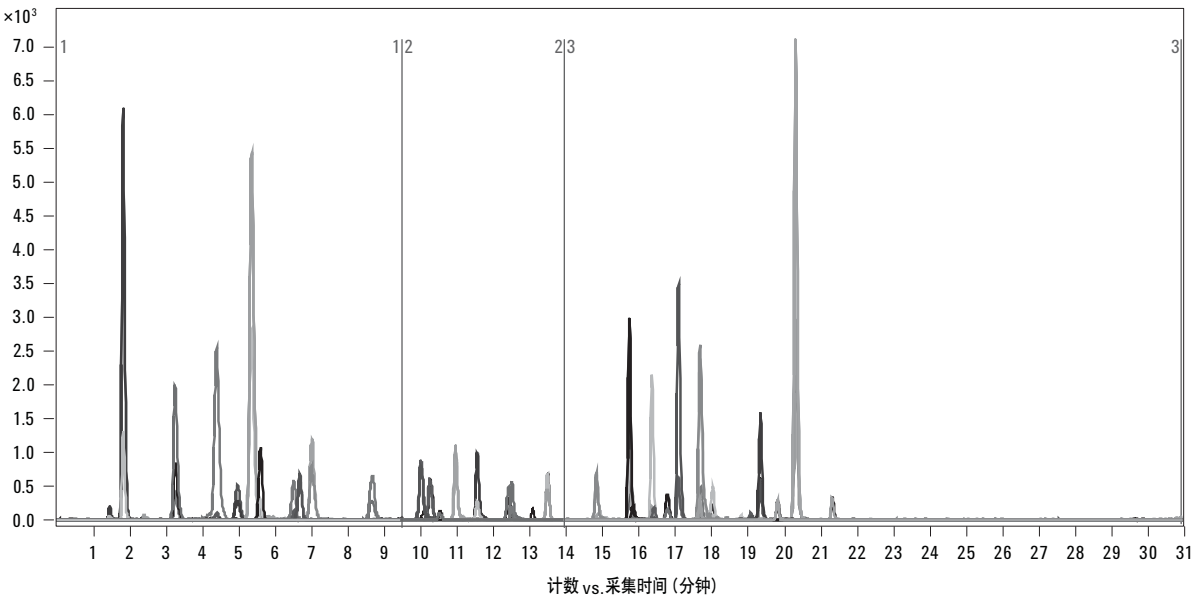


图 1A. 第 1 组药物的 MRM 提取离子色谱图，利用了色谱分离过程中的三个时间片段

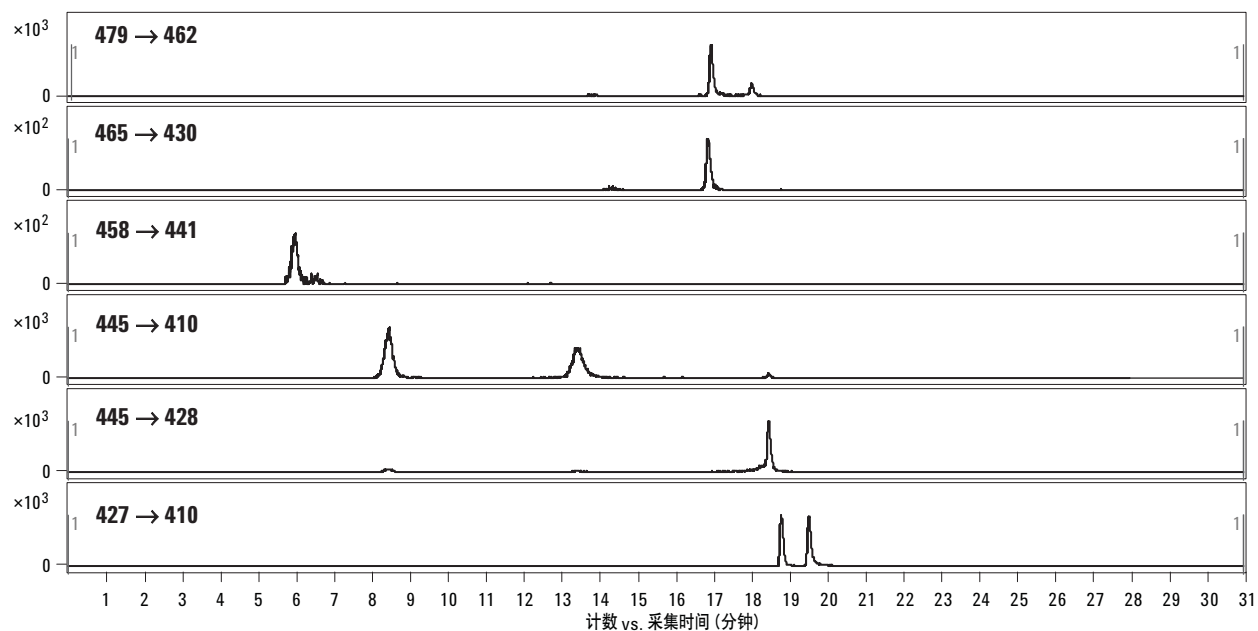


图 1B. 第2组药物的MRM提取离子色谱图，仅显示一种transitions。化合物的鉴定结果见表2B

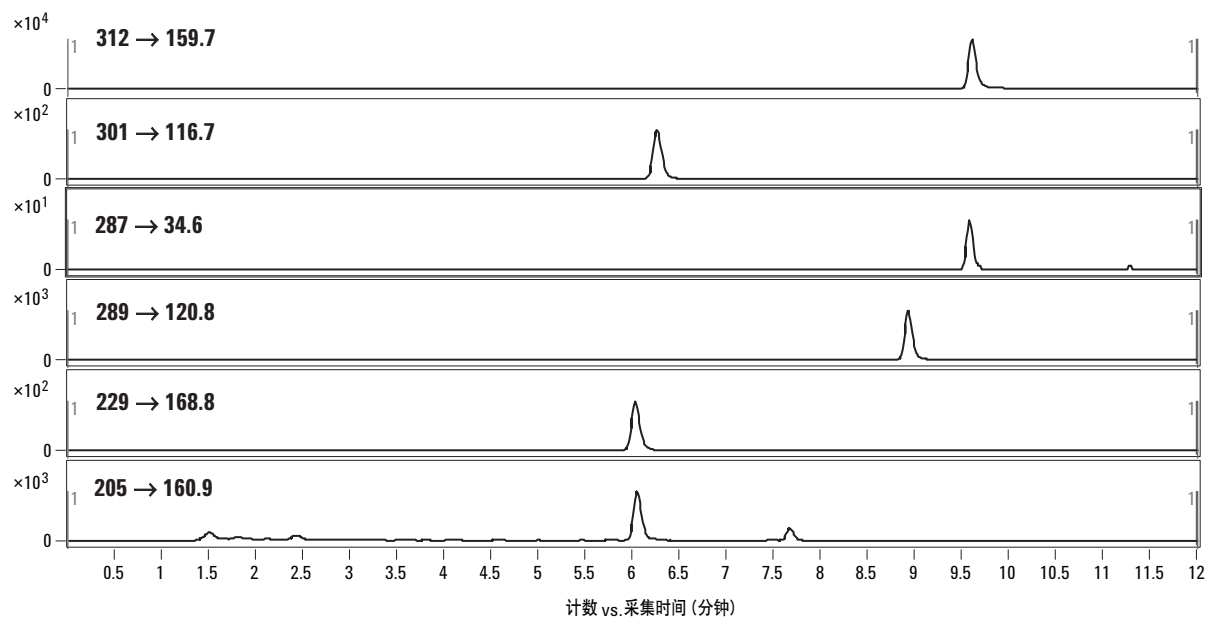


图 1C. 第3组药物的MRM提取离子色谱图，仅显示一种transitions。化合物的鉴定结果见表2C

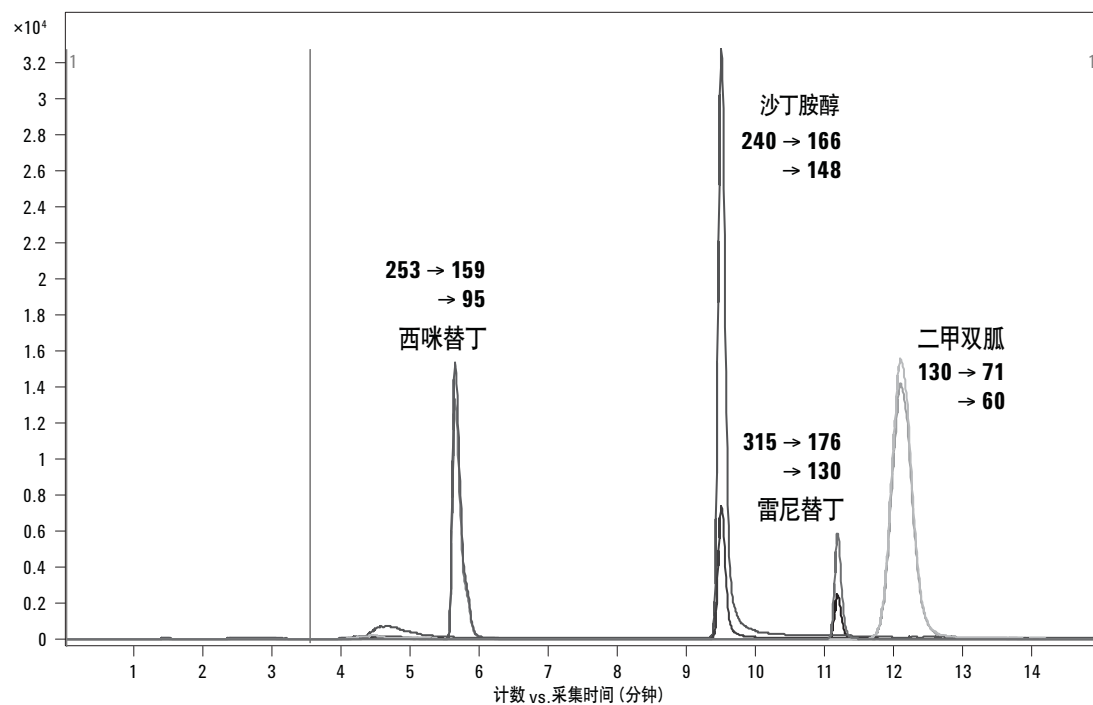


图 1D. 第 4 组药物的 MRM 提取离子色谱图

对污水样品的实际应用

为了证实本方法对实样分析的适用性，用污水处理厂出口处的污水作为基质，制备了 8 种浓度水平（0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 和 500 ng/mL 或 ppb）的加标样品进行分析。以对乙酰氨基酚的标准曲线为例，如图 2 所示。总之，所有的化合物均显示了出色的灵敏度，并且在三个数量级的浓度范围内表现出良好的线性， $r^2 \geq 0.99$ 。

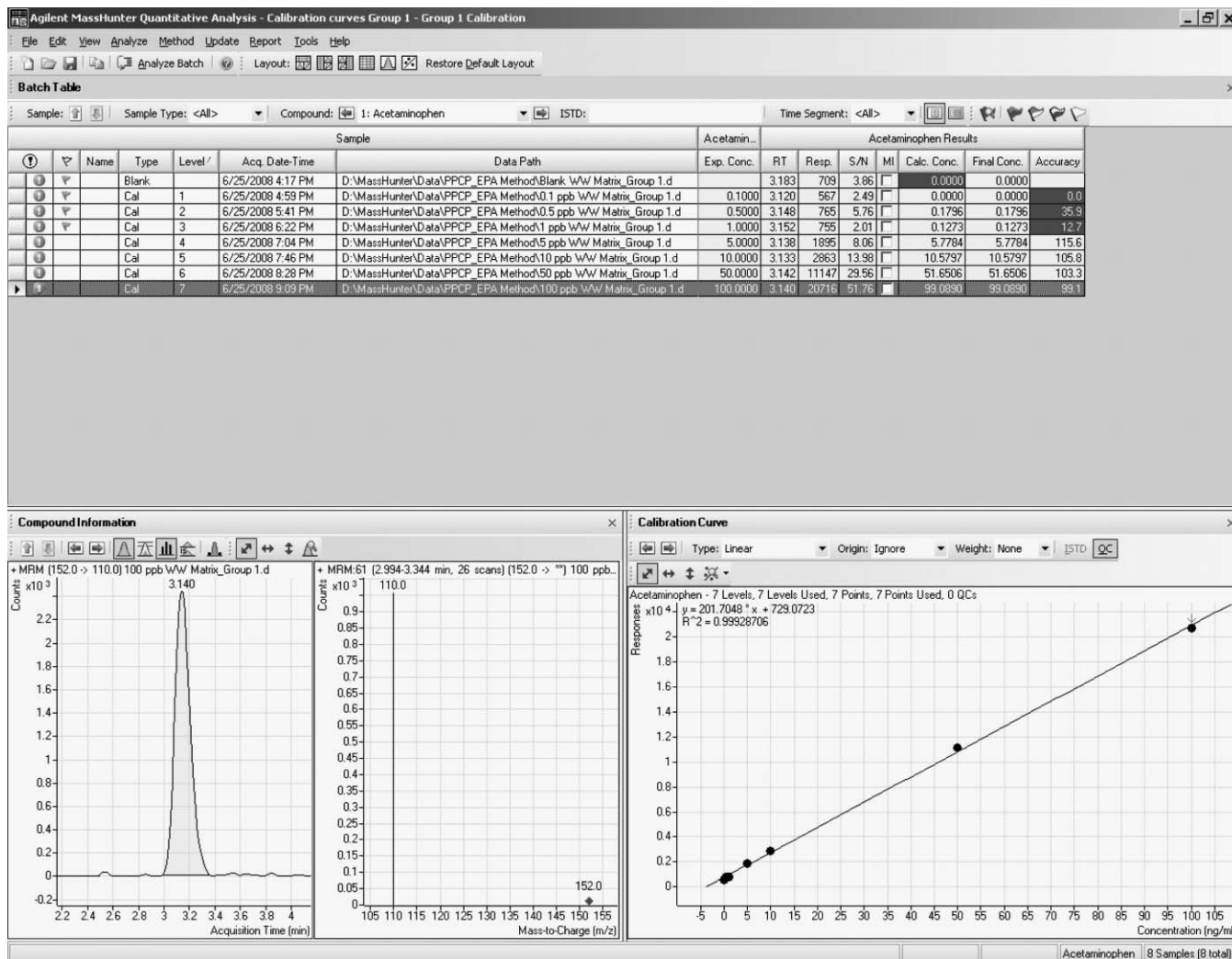


图2. 污水基中对乙酰氨基酚的7点校正曲线，浓度范围为0.1~100 ng/mL (ppb)，线性拟合不通过原点

最后，对“空白”污水样品进行分析，检出其中存在两种药物——卡马西平和苯海拉明，用两种 MRM transitions 对其进行结构确证。污水提取物中这两种化合物的定性离子比见图3。如图3中两种 MRM 提取离子色谱图所示，由于 MRM transitions 的选择性和仪器的高灵敏度，尽管这两种化合物存在于如此复杂的基质中，仍然能够方便地得到鉴定。

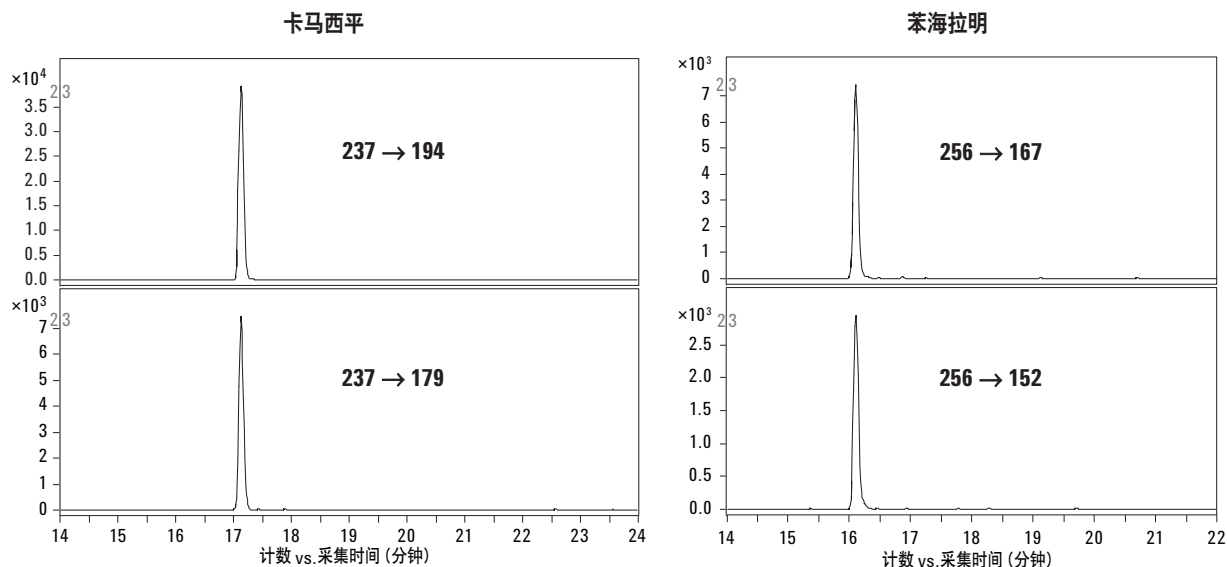


图3. 污水样品中卡马西平和苯海拉明的两种 MRM transitions 色谱图

结论

本次研究的结果显示, 对于高通量方法在水样中药物研究的应用, Agilent 6410A 三重串联四极杆质谱仪是一种稳健的、灵敏的和可靠的仪器。Agilent 6410A 三重串联四极杆质谱仪能够确保 EPA 方法 1694 的成功实施。

参考文献

1. 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.

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误, 以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标, 如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2008
中国印刷
2008 年 9 月 19 日
5989-9665CHCN



Agilent Technologies