

# Método LC-MS/MS de cambio de polaridad cuantitativa para pesticidas PPCP en muestras de agua ambiental

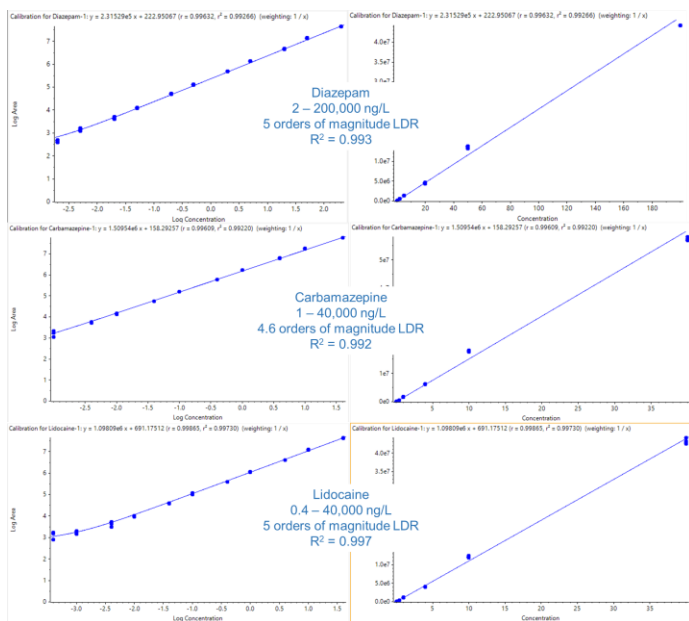
Optimizando los análisis de agua con el sistema SCIEX Triple Quad™ 5500+ – QTRAP® Ready

KC Hyland<sup>1</sup>, Robert Di Lorenzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SCIEX, USA; <sup>2</sup>SCIEX, Canada

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCP) representan una clase de contaminantes relevantes en el medio ambiente y muestras de agua que han sido afectadas por la actividad humana. La capacidad de detectar y cuantificar de manera confiable y sensible estas diversas especies antropogénicas en el agua y otros sistemas es crítica en la evolución continua de los marcos y estándares reguladores en todo el mundo.

Durante años, la LC-MS/MS de triple cuadrupolo se ha considerado el estándar más alto para la calidad de los datos y



**Figura 1. Rango dinámico lineal (LDR) demostrado para un panel de analitos químicamente diverso.** El aumento de LDR en un flujo de trabajo cuantitativo para residuos en el ambiente permite que el método de adquisición capture un mayor potencial de datos de ocurrencia en menos inyecciones (menor necesidad de repeticiones después de una dilución adicional, por ejemplo). Se muestran tres analitos de ejemplo con una excelente respuesta lineal desde el rango de concentración muy bajo (ng/L o subng/L) hasta el extremo superior de la curva (rango ng/mL), con potencial para concentraciones aún más altas aún comportarse linealmente. Las curvas de calibración en los paneles laterales izquierdos se muestran en escala log-log para ver visualmente el rango completo del comportamiento del punto de calibración. Las curvas de calibración de espacio lineal típicamente utilizadas se muestran en los paneles laterales derechos.



el rendimiento del método en el análisis cuantitativo de PPCP. Los aspectos de este enfoque tecnológico lo hacen particularmente adecuado para el propósito de esta aplicación. Específicamente, la sensibilidad para detectar niveles de trazas en sistemas acuáticos diluidos; la selectividad para medir con confianza un analito en la presencia de matrices ambientales complejas; la respuesta dinámica lineal para abarcar un rango de concentraciones ambientales potenciales; robustez para manejar el rendimiento de muestras importantes sin degradación de la calidad de los datos; y la precisión y reproducibilidad en la cuantificación para subrayar importantes conclusiones científicas que se extraen.

El sistema SCIEX 5500+ se presenta como una plataforma cuantitativa con un rendimiento excepcional en velocidad, cambio de polaridad, rango dinámico lineal y manejo de datos fácil de usar con el software SCIEX OS-Q.

## Ventajas clave - Sistema SCIEX 5500+ – para análisis de PPCP

- Rendimiento de conmutación de polaridad del SCIEX Triple Quad 5500+: el sistema QTRAP Ready se muestra en la capacidad de combinar grandes cantidades de analitos (~300 transiciones MRM) en un solo método
- Se logra un amplio rango dinámico lineal (LDR) en la respuesta para PPCP en agua, y permite la ventaja de la detección sobre un amplio potencial de concentraciones relevantes de residuos ambientales
- Se puede lograr un tiempo de ejecución cromatográfico inferior a 10 minutos con el algoritmo combinado MRM™ programado y el cambio de polaridad durante la adquisición

## Métodos

**Muestras:** Se recolectaron muestras de agua de una variedad de fuentes ambientales e interiores para evaluar el rendimiento del método en matrices relevantes e informar tanto datos de ocurrencia como de recuperación.

**Adquisición de Datos:** El sistema SCIEX Triple Quad 5500+ - QTRAP Ready junto con el sistema ExionLC™ AD se empleó para la separación de muestras, la inyección y el análisis MRM. La fuente de ionización Turbo V™ se hizo funcionar en modo de ionización por electroaspersión (ESI) en polaridades positivas y negativas. Una columna Phenomenex C18 Luna Omega Polar demostró el nivel de separación y la resolución cromatográfica requerida; las condiciones cromatográficas y de fuente de iones se muestran en la Tabla 1, y el gradiente cromatográfico se muestra en la Tabla 2.

Este método tiene 298 transiciones MRM programadas con conmutación de polaridad positiva y negativa, por lo que el tiempo de conmutación de polaridad de 5 ms es crítico para lograr una cobertura integral y calidad de datos tanto en modo positivo como negativo. Se utilizaron estándares mixtos que contenían 131 analitos de productos farmacéuticos y de cuidado personal para la optimización del método, así como para la construcción de curvas de calibración externas.

**Procesamiento de Datos:** La plataforma de software integrada SCIEX OS-Q se utiliza para el procesamiento de datos. El módulo de análisis es la interfaz principal para el análisis cuantitativo y todas las curvas de calibración, LOQ, parámetros de integración, cálculos de concentración, cálculos de precisión y análisis estadísticos se realizan dentro de este módulo.

**Tabla 1. Resumen de las condiciones de LC-MS.**

Condiciones Cromatográficas			
LC Column	Phenomenex C <sub>18</sub> Luna Omega Polar 1.7 μm, 2.1 x 150 mm		
Fase Movil A	Agua + 0.1 % formic acid + 5 mM ammonium formate		
Fase Movil B	Metanol		
Rango de Flujo	0.5 mL/min		
Temp. de Columna	40°C		
Volúmen de Inyección	100 μL		
Condiciones de Espectrometría de Masas			
CUR	25 psi	CAD	10 psi
IS Voltaje	2500V / -2500V	TEM	650°C
GAS 1	50 psi	GAS 2	70 psi

**Tabla 2. Gradiente cromatográfico.**

Tiempo Total (min)	Rango de Flujo (μL/min)	A%	B%
0.50	500	100	0
0.51	500	75	25
2.50	500	40	60
7.00	500	0	100
8.50	500	0	100
8.51	500	100	0
10.00	500	100	0

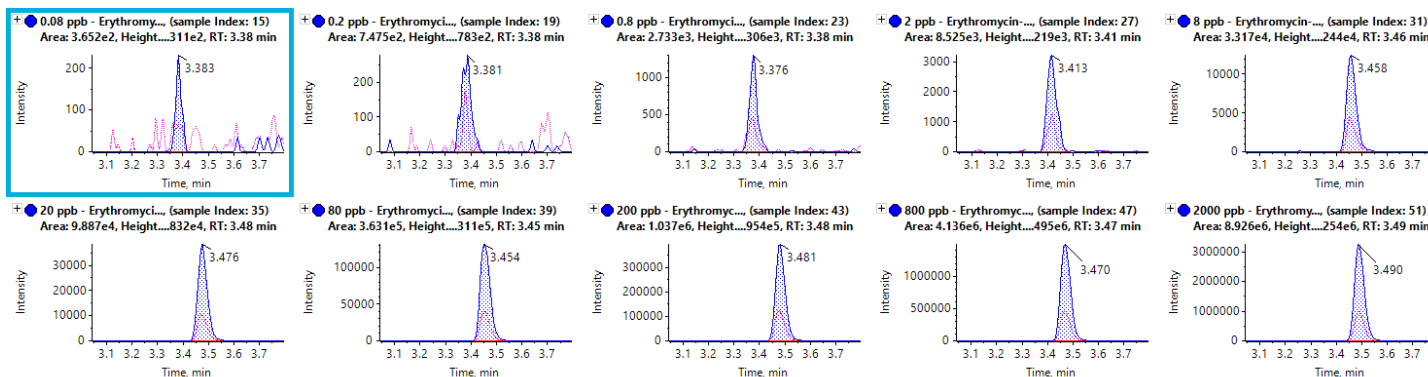
## Desarrollo del Método

### 1. Linealidad, exactitud, precisión

Maximizar el rango dinámico lineal en los análisis ambientales es ventajoso en la capacidad de seleccionar un amplio rango potencial de concentraciones relevantes de residuos ambientales, mientras minimiza los pasos de preparación de la muestra (como la dilución, concentración o la construcción de múltiples curvas de calibración externas); minimizando los pasos de procesamiento de datos; y mitigar potencialmente la necesidad de volver a inyectar muestras que, de lo contrario, podrían quedar fuera de una curva de calibración de rango inferior. Muchos de los PPCP en el panel objetivo fueron cuantificables en una curva lineal desde el rango de partes por billón o subpartes por trillón (ppt o ng/L) hasta el rango de partes por billón (ppb o ug/L). El potencial de variación drástica en los niveles de presencia detectados de este conjunto diverso de productos químicos en muestras complejas de agua ambiental necesita esta capacidad para un alto rango de respuesta lineal. La Figura 1 muestra curvas de calibración con rangos de concentración, rangos lineales de órdenes de magnitud y valores de r<sup>2</sup> de algunos compuestos de ejemplo.

### 2. Sensibilidad

Sensibilidad del sistema SCIEX Triple Quad 5500+: QTRAP Ready se evaluó determinando los valores del límite inferior de cuantificación (LLOQ) del método para el panel objetivo de PPCP. Los valores LOQ se determinaron como el estándar de calibración de concentración más baja que se ajusta a los requisitos de rendimiento estándar de: relación señal/ruido de al menos 10; precisión de concentración calculada dentro del 30% del 100%; y que caen en una curva de calibración lineal con un valor de r<sup>2</sup> de al menos 0,995. La Figura 2 muestra la intensidad pico observada desde un nivel muy bajo (0.1 ng/L) hasta estándares de concentración cada vez más altos para el



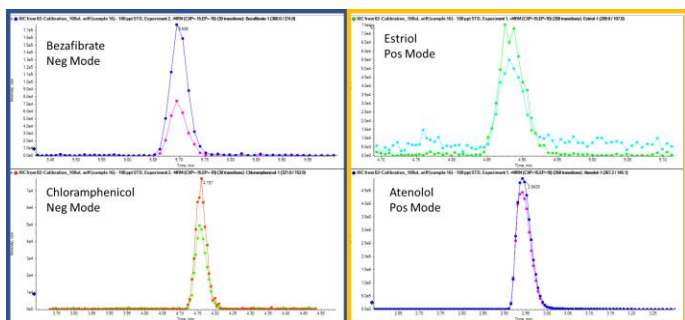
**Figura 2. Rango Dinámico y Sensibilidad.** Usando la eritromicina como ejemplo, se ilustra la sensibilidad y el rango dinámico del método LC-MS/MS. De arriba a la izquierda a la derecha, los picos de cafeína se muestran desde una concentración de 80 ng/mL (0.08 ppb) hasta 2,000,000 ng/mL (2,000 ppb). Incluso en los niveles de alta concentración, se observa que la forma y la calidad del pico se conservan, y la respuesta ( $r^2 = 0.99447$  para la eritromicina) permanece lineal.

contaminante del ejemplo, la cafeína, mientras que la Tabla 3 resalta los valores de LLOQ para un subconjunto de compuestos.

### 3. Cambio de polaridad y algoritmo MRM programado

El cambio de polaridad es un enfoque enormemente ventajoso para el análisis cuantitativo de un gran panel de contaminantes químicamente diversos, como los PPCP. La capacidad de ionizar un panel mayor de diversos compuestos químicos demuestra una y otra vez que es muy relevante para los análisis ambientales y los contaminantes químicos encontrados.

La velocidad a la que el espectrómetro de masas puede manejar el cambio de polaridad puede tener un impacto directo en el tiempo de ciclo del instrumento. Se sabe que la integridad y la calidad de cualquier resultado cuantitativo dependerá de la integración consistente y precisa de los picos cromatográficos utilizados para generar datos de concentración. Para este fin, es fundamental que se recopile una cantidad adecuada de puntos de datos en el pico para garantizar una integración,



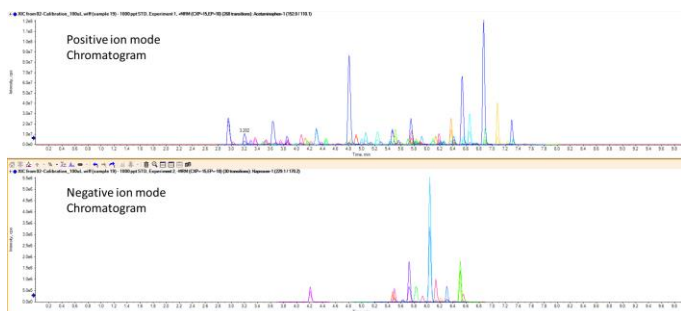
**Figura 3. Cambio rápido de polaridad para un buen muestreo de datos.** El bezaifibrato, el cloranfenicol, el estriol y el atenolol muestran una cobertura de puntos de datos suficiente para la calidad de la integración y la confianza en los resultados cuantitativos.

cuantificación y confirmación confiables del pico. La Figura 3 muestra los puntos de datos recopilados en algunos picos cromatográficos de ejemplo para el análisis de PPCP, mientras que la Figura 4 muestra un perfil cromatográfico completo para ambos modos de polaridad.

El tiempo de ciclo del método es crucial para garantizar la recolección confiable de puntos de datos y la forma máxima. La velocidad de conmutación de polaridad en el sistema SCIEX 5500+ más la adquisición del algoritmo MRM programado hace

**Tabla 3. Valores límite de cuantificación (LOQ) y% CV para un pequeño subconjunto de 15 PPCP de ejemplo.**

Nombre	LOQ (ng/L)	%CV at LOQ	%CV at 10x LOQ	Polaridad
Atenolol	2	6%	1%	Pos
Carbadox	20	24%	17%	Pos
Carbamazepine	1	7%	2%	Pos
Chloramphenicol	2	13%	6%	Neg
Erythromycin	8	9%	9%	Pos
Glipizide	0.8	11%	2%	Neg
Hydrocortisone	4	16%	2%	Pos
Lidocaine	0.4	23%	3%	Pos
Lincomycin	0.4	23%	7%	Pos
Norethindrone	20	14%	7%	Pos
Progesterone	0.4	9%	5%	Pos
Sulfadiazine	1	17%	9%	Pos
Sulfamethoxazole	10	13%	8%	Pos
Trimethoprim	2	15%	12%	Pos
Warfarin	1	13%	13%	Neg



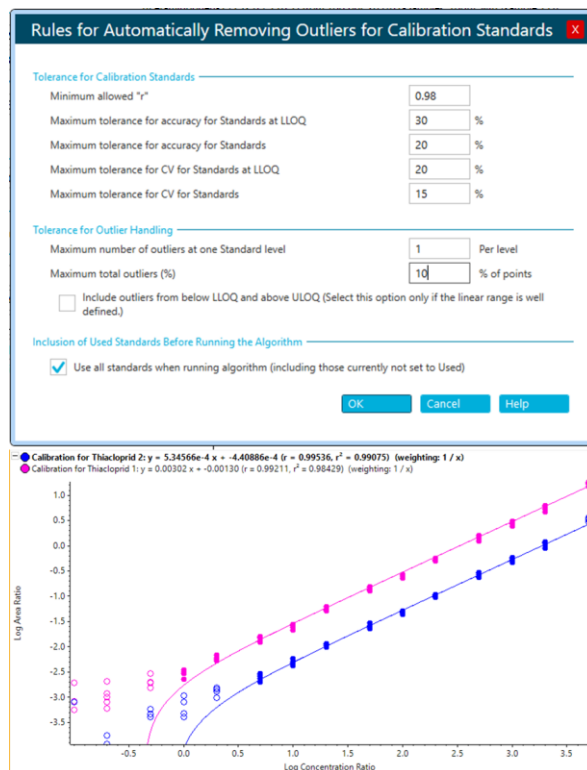
**Figura 4. Descripción general de la cromatografía.** Utilizando el algoritmo MRM programado en el software Analyst 1.7, se utilizaron 298 transiciones MRM para detectar todos los analitos dentro de una ventana de 10 minutos en un solo método.

posible la reducción del tiempo de ciclo del método y al mismo tiempo preserva la calidad de los datos. Esto también permite la reducción del tiempo total del método por inyección, al hacer que los tiempos de ejecución cromatográfica sean más cortos con más coelución máxima posible sin pérdida de capacidad cuantitativa. Lograr una forma de pico optimizada mediante la recopilación de puntos de datos adecuada tiene el efecto adicional de proporcionar la máxima precisión y reproducibilidad posibles en los datos informados.

#### 4. Maximizando la eficiencia en el procesamiento de datos

Se utilizó el software SCIEX OS-Q para procesar datos cuantitativos, incluida la función de eliminación automática de valores atípicos, para reducir de manera eficiente la cantidad de tiempo que administra las curvas de calibración y los datos lineales para > 200 transiciones MRM en el panel de analitos. La Figura 5 (arriba) muestra una captura de pantalla del software que describe los parámetros que se pueden definir de modo que las curvas de calibración se definan solo por los puntos estándar que se ajustan a los criterios apropiados de precisión, variabilidad y linealidad.

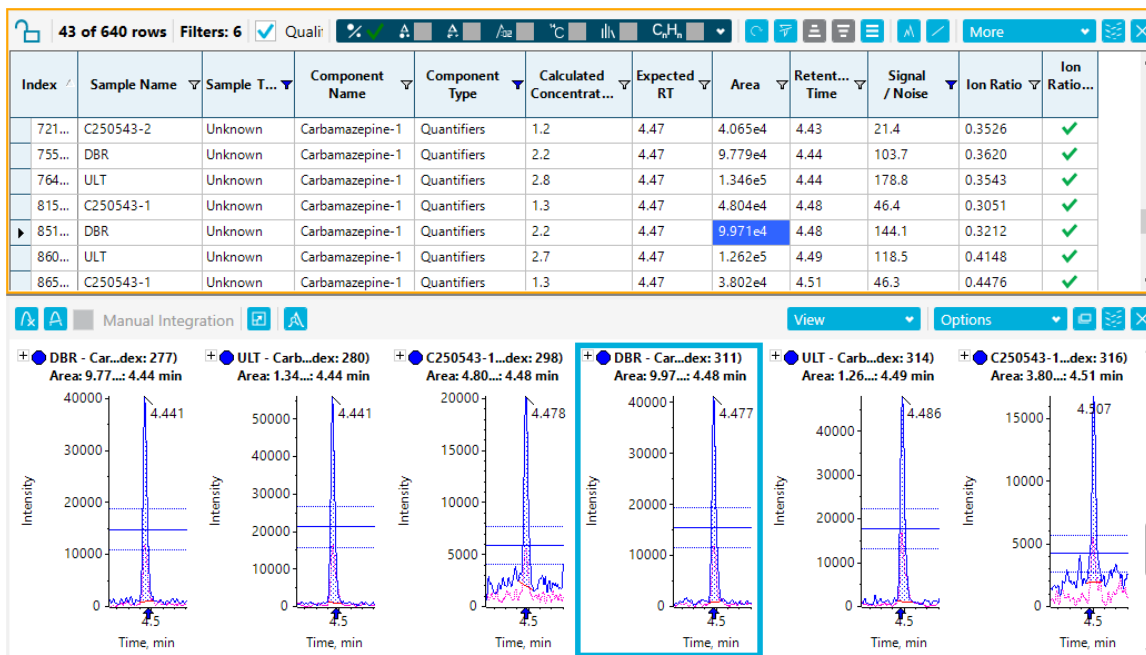
Como muestra la Figura 5, el usuario puede definir niveles de tolerancia para % CV, precisión y valor r. La curva de calibración de ejemplo para el plaguicida Tiacloprid muestra los puntos excluidos automáticamente en el extremo inferior de la curva (la curva de calibración se muestra estrictamente en la escala log-log para poder visualizar el extremo inferior fácilmente). Debido a que estos criterios de eliminación de valores atípicos pueden aplicarse a todo el panel en el momento del procesamiento de datos y guardarse como parte del método de procesamiento, esto garantiza un tratamiento y manejo coherente y objetivo de los puntos estándar; una tarea que de otro modo podría llevar a



**Figura 5. La función de eliminación automática de valores atípicos en el software SCIEX OS-Q.** Permite el manejo rápido e imparcial de los datos de calibración para cientos de compuestos y reduce el tiempo dedicado a la manipulación manual. Los círculos abiertos representan curvas de calibración estándar que se eliminan automáticamente por no cumplir con los criterios de rendimiento definidos, lo que permite una mayor confiabilidad en los resultados cuantitativos. Para el compuesto de ejemplo que se muestra tiacloprid, se puede ver que la respuesta lineal en el extremo inferior de la curva comienza a fallar; la respuesta no se vuelve significativamente diferente de una respuesta en blanco. La herramienta de eliminación automática de valores atípicos fue capaz de eliminar los puntos finales bajos de la curva que tienen un rendimiento deficiente, para mantener una curva de calibración que cumpla con los criterios deseados necesarios para el rendimiento cuantitativo.

un analista capacitado una cantidad significativa de tiempo y estar inherentemente sujeta a prejuicios humanos.

Además, el usuario puede definir límites de tolerancia que definen un "golpe positivo" en una muestra desconocida, como una tolerancia alrededor de la relación iónica o el delta del tiempo de retención, y estos también se pueden manejar rápidamente en la interfaz del software a través de opciones avanzadas de filtrado y marcado creadas en la tabla de resultados. Una vez más, estas características abordan los cuellos de botella conocidos en el procesamiento de datos y reducen la subjetividad humana en el manejo de datos.



**Figura 6. Detección del compuesto farmacéutico Carbamazepina en varias muestras de agua superficial.** La concordancia en las proporciones de iones entre incógnitas y estándares (las marcas de verificación verdes en la tabla de resultados designan la tolerancia de la proporción de iones dentro del 20%) proporcionan una confirmación cualitativa de Carbamazepina. Los picos cromatográficos para las dos transiciones MRM para el compuesto también se muestran superpuestos con las líneas de tolerancia del 20% para la visualización del acuerdo IR. El pico azul es el rastro del ion cuantificador, y el pico rosa es el rastro del ion calificador. Cuando el pico del calificador cae entre las líneas de tolerancia de la relación iónica, la confirmación de la relación iónica se puede visualizar cualitativamente.

## Resultados experimentales

### Análisis de muestras de agua para PPCPs

Se recolectaron muestras desconocidas de varios sitios de muestreo de aguas superficiales, así como algunas fuentes de agua de grifo interiores, un agua destilada y un agua embotellada. Estos se analizaron utilizando el método de adquisición de datos descrito y los resultados demuestran la aparición de varios PPCP comunes en diferentes niveles. Los analitos detectados en las aguas se cuantificaron frente a las curvas de calibración externas preparadas en solvente, usando estándares internos deuterados para un subconjunto del panel, y se confirmaron usando relaciones iónicas para dos transiciones MRM para cada compuesto. Se inyectaron hasta 14 réplicas de cada muestra desconocida para evaluar la reproducibilidad del método y la robustez del instrumento con una matriz más compleja (agua superficial).

La preparación de muestras de estos desconocidos es como se describe en las secciones anteriores e implicó una inyección directa sin la inclusión de pasos de limpieza. Con muestras analizadas directamente como estas, es especialmente importante caracterizar cómo se conserva la calidad de los datos en muchas inyecciones. Los resultados de este experimento

muestran que los PPCP son detectables y prevalentes en nuestras aguas muestreadas ambientalmente.

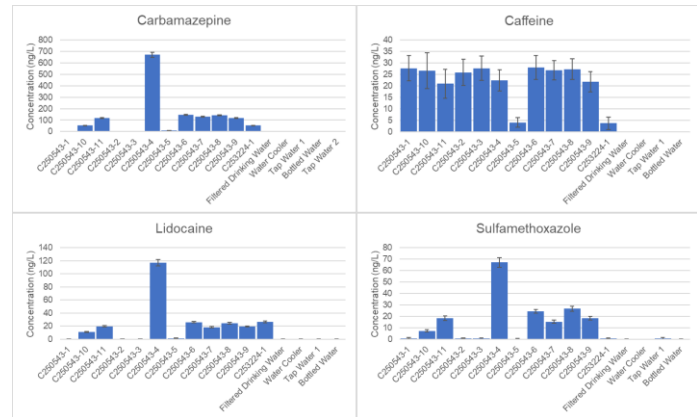
Algunos PPCP tienen una frecuencia muy alta de ocurrencia; por ejemplo, se detectaron carbamazepina y cafeína en todas o casi todas las muestras de agua superficial; El acetaminofén, el bisfenol A y el DEET también se encuentran entre las especies detectadas con mayor frecuencia. Una muestra de agua superficial contenía 14 especies detectadas del panel, incluyendo pesticidas (imidacloprid, carbofuran, azoxystrobin); productos farmacéuticos (acetaminofeno, sulfametoxazol, carbamazepina); y otras clases de compuestos (DEET, cafeína) con concentraciones de hasta cientos de ng / L. Una de las fuentes de agua del grifo tuvo dos resultados para DEET y Bisfenol A, y la otra tuvo tres para acetaminofén, DEET y cafeína. En la Figura 7, los resultados de detección y cuantificación de carbamazepina, sulfametoxazol, lidocaína y cafeína en las muestras de agua recolectadas se muestran como ejemplos de compuestos detectados a través de múltiples muestras y tipos de muestra. de pasos de limpieza. Con muestras analizadas directamente como estas, es especialmente importante caracterizar cómo se conserva la calidad de los datos en muchas inyecciones. Los resultados de este experimento muestran que los PPCP son detectables y prevalentes en nuestras aguas muestreadas ambientalmente.

Figura 6 muestra el compuesto de ejemplo Carbamazepina confirmado en varias muestras; el software SCIEX OS-Q presenta una pantalla verde con una marca de verificación que resalta las muestras que cumplen o pasan criterios definidos; en este caso, que pasan el límite de tolerancia del 20% para la relación iónica que se definió como confirmación de identidad cualitativa. El software también permite el filtrado en esta columna de modo que la tabla de resultados muestre solo muestras que pasan (o fallan) estos criterios.

## Resumen

Este informe describe el uso del SCIEX Triple Quad 5500+ Sistema LC-MS / MS - QTRAP Listo para establecer un sistema optimizado método para el análisis cuantitativo de antropogénico contaminantes en muestras de agua ambiental. El método combina la electropulverización de polaridad positiva y negativa modos de ionización en un método de detección integral, que escanea una amplia gama de analitos sin ningún sacrificio o comprometer la calidad e integridad de los datos. Excepcional sensibilidad y rango dinámico lineal proporcionan la base para un Metodología cuantitativa robusta para este gran panel de productos químicos especies diversas.

La eficiencia en el procesamiento de datos con el software SCIEX OS-Q es aumentó con la capacidad de emplear características de racionalización tales como: eliminación automática de valores atípicos, sistema de semáforo confirmatorio para puntuación y revisión rápida de datos, y AutoPeak inteligente Pico de integración.



**Figura 7. Cuantificación a través de varias muestras de agua.** Se muestran cuatro analitos de ejemplo que se detectaron en las muestras de agua, a algunos niveles medidos muy altos (> 100 ng/L). También se muestran barras de error de desviación estándar que demuestran una excelente reproducibilidad experimental entre réplicas.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein, including associated logos, are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners in the United States and/or certain other countries.

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-9672-A. AB SCIEX™ is being used under license. RUO-MKT-02-9672-A