



# 基于 Agilent 7696A 样品制备工作台的气相色谱/三重四极杆质谱进行雌酮分析

## 应用简报

### 作者

Peter Mrozinski

美国

特拉华州威尔明顿

安捷伦科技公司

Selene Hernandez Ruiz 博士

美国

亚利桑那州图森市

亚利桑那大学

化学与环境工程系

Anthony Macherone 博士

美国

特拉华州威尔明顿

安捷伦科技公司

### 摘要

内分泌干扰物（包括新型污染物或持久性有机污染物）在临床化学、工业性接触、药物发现和开发以及环境检测等许多实验室和交叉学科中的分析需求越来越大。这些实验室面临的巨大需求不仅给分析测量工具增添了负担，也对样品制备的高准确度和重现性提出了新的挑战。本应用简报将简要描述利用自动化工作流程将 Agilent 7696A 样品制备工作台应用于 GC/MS/MS 分析的样品制备步骤。



**Agilent Technologies**

## 前言

目前,对准确分析地下水、地表水以及饮用水水源中所含雌激素、雄激素、黄体酮、皮质类固醇和糖皮质激素等内分泌干扰物(EDC)的需求呈逐渐增长的趋势。环境中的这些化合物主要来源于人及农畜的人为医源性激素治疗。通常,无法通过传统的污水处理工艺完全降解排泄物中的未代谢母体药物及其代谢物。因此,这些化合物会存在于河流等淡水水体中并转移到地质含水层。这些物质即使处于 ppt 级也会造成不利的影响,包括但不限于:鱼类及两栖动物雌雄比例失调、鱼类可逆型雌性化、抑制繁殖、形态学发生改变(如雌雄同体的发生率升高)以及信息素反应紊乱等等。这些化合物经过数十年的广泛使用已成为威胁人类健康的一类无处不在的持久性有机污染物。因此,有关这类物质在环境中转移和归趋的研究就显得尤为重要。本应用简报描述了如何在 7696A 样品制备工作台上实现校准物制备及衍生化等一系列自动化样品制备过程,通过 GC/MS/MS 来进行一组已知内分泌干扰物的分析。

## 实验部分

### 标准品和试剂

雌酮(E1)、BSFTA/TCMS(99%/1%)、无水乙腈和无水吡啶购自 Sigma-Aldrich(美国)。E1 储备液在无水乙腈中制得,并用于配制制备校准物所需的工作液。

### 仪器

可通过 Agilent 7696A 样品制备工作台来配制校准标准样,并进行分析物的自动衍生化。测量实验则通过 Agilent 7890A 系列气相色谱联用 Agilent 7000B 三重四极杆 GC/MS 来完成。气相色谱配有多种模式进样口(MMI)和 Agilent 7693A 150 位自动进样器。进样模式为冷不分流进样;离子源为 EI 源。仪器条件如表 1 和表 2 所示。

表 1. GC/MS 条件

#### 气相色谱运行条件

分析柱	两根 15 m HP-5MS UI 柱(部件号 19091S431UI),采用安捷伦吹扫 Ultimate 接头(部件号 G1472A)串接
进样体积	2 $\mu$ L
进样模式	采用多模式进样口(MMI)的冷不分流进样
进样口温度	在 70 $^{\circ}$ C 下保持 0.01 min 以 450 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C,保持 3 min
载气节省	20 mL/min(3 min 后)
吹扫气流	1.5 min 时 30 mL/min
制冷	开
制冷温度	72 $^{\circ}$ C
故障检测	30 min
超时检测	在 10 min 时
柱箱温度	120 $^{\circ}$ C 保持 0.5 min,以 40 $^{\circ}$ C/min 升至 240 $^{\circ}$ C,保持 0 min 以 5 $^{\circ}$ C/min 升至 280 $^{\circ}$ C,保持 3.75 min
载气	氦气恒流模式 色谱柱 1: 0.8 mL/min 色谱柱 2: 1.0 mL/min
平均速度	23.498 cm/s
传输线温度	280 $^{\circ}$ C
运行时间	15.25 min
质谱条件	
调谐	atunes.eiex.tune.xml
增益因子	50
采集参数	多反应监测(MRM)
碰撞气体	1.5 mL/min
淬灭气体	2.25 mL/min
溶剂延迟	6.0 min
MS 温度	离子源 300 $^{\circ}$ C 四极杆 150 $^{\circ}$ C

表 2. MRM 参数

时间段	开始时间	化合物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间(ms)	碰撞能量(V)
1	10.5	E1	342.0	257.0	150	15
1	10.5	E1	342.0	244.0	150	15

## 使用 Agilent 7696A 样品制备工作台制备样品

Trinh 等人 (2011) 的研究表明：在样品浓缩 1000 倍（1.0 L 样品体积浓缩至 1.0 mL）的前提下，E1 的方法检测限接近 1.0 ng L<sup>-1</sup>。对于该评估，采用 7696A 样品制备工作台配制了五种不同浓度的校准物，浓度分别为：1.0、2.5、5.0、10.0 和 50.0 ng/mL。对于衍生化反应，同样也在 7696A 样品制备工作台上配制体积百分比为 10/10/80 的 BSTFA + TCMS/无水吡啶/无水乙腈储备试剂，然后加入干燥后的校准物中，加热至 60 °C 反应 30 min。

## 结果与讨论

### 7696A 样品制备工作台样品制备

7696A 样品制备工作台的自动化大大缩短了分析人员在样品制备上耗费的时间，在保证人工制备所具有的回收率和精度的同时消除了采样误差的可能性。在本应用简报中，在 1.0 ng/mL 的浓度下（1 pg 柱上样量）重复进样三次确定回收率为 133.37%，五个水平平均精度的 RSD 为 5.162%（范围 3.32%-6.89%）。表 3 和表 4 给出结果。图 1 显示了 1.0 ng/mL 浓度下或柱上样量为 1 pg 时 E1 的定量和定性 SRM 谱图。

表 3. 1.0 ng/mL (1 pg 柱上样量) 低浓度校准物的信噪比以及 % 回收率

名称	样品类型	级别	E1 方法实验浓度	峰面积	E1 最终浓度	信噪比
Std_1_1	Cal	1	1.0 ng/mL	48.18	1.29	11.20
Std_1_2	Cal	1	1.0 ng/mL	42.01	0.94	9.00
Std_1_3	Cal	1	1.0 ng/mL	45.97	1.17	12.40
					% 回收率	113.37

表 4. 5 种不同浓度下校准物的 %RSD (n=3)

名称	样品类型	级别	实验浓度	E1 峰面积	
Std_1_1	Cal	1	1	48.18	
Std_1_2	Cal	1	1	42.01	
Std_1_3	Cal	1	1	45.97	
				% RSD	6.89
Std_2_1	Cal	2	2.5	65.86	
Std_2_2	Cal	2	2.5	65.75	
Std_2_3	Cal	2	2.5	59.74	
				% RSD	5.49
Std_3_1	Cal	3	5	134.20	
Std_3_2	Cal	3	5	147.65	
Std_3_3	Cal	3	5	137.09	
				% RSD	5.07
Std_4_1	Cal	4	10	184.80	
Std_4_2	Cal	4	10	167.32	
Std_4_3	Cal	4	10	173.81	
				% RSD	5.04
Std_6_1	Cal	5	50	931.48	
Std_6_2	Cal	5	50	874.49	
Std_6_3	Cal	5	50	887.74	
				% RSD	3.32

## GC/MS/MS 分析

对于本研究, 在 1.0 - 50.0 ng/mL 范围内的五个浓度水平下分别重复进样三次。图 2 为共 15 个进样所得的校准曲线, 相关系数  $R^2$  为 0.996。

## 仪器检出限

Wells 等人 (2011) 指出: 若样本集小于 30, 可用单尾 Students-t 分布来估算仪器检出限 (IDL)。对于 99% 的置信度和  $n-1$  的自由度, 本研究对应的 Students-t 表值为 6.965。将低浓度校准物对应的 6.965 和 6.89% RSD 代入 IDL 方程 (式 1), 估算出柱上 E1 的 IDL 为 0.48 pg。该值与 Trinh 等人 (2011) 测定的 0.7 ng L<sup>-1</sup> 的方法检测限 (99% 置信度,  $n=7$ ) 非常吻合。

$$IDL_{\%RSD} = \frac{(6.965 \times 6.89\% \times 1.0 \text{ pg})}{100} = 0.48 \text{ pg}$$

公式 1. 基于 1.0 ng/mL 校准物的峰面积 % RSD ( $n=3$ ) 估算的 IDL

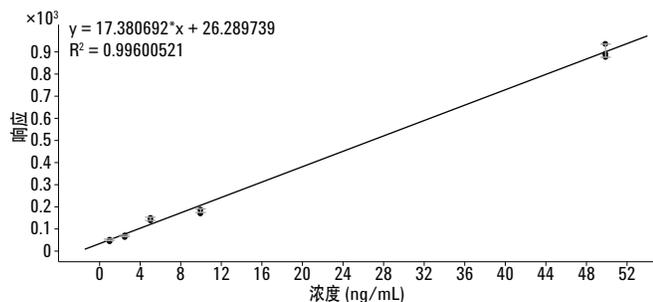


图 2. E1 校准曲线: 在五种浓度下重复进样三次

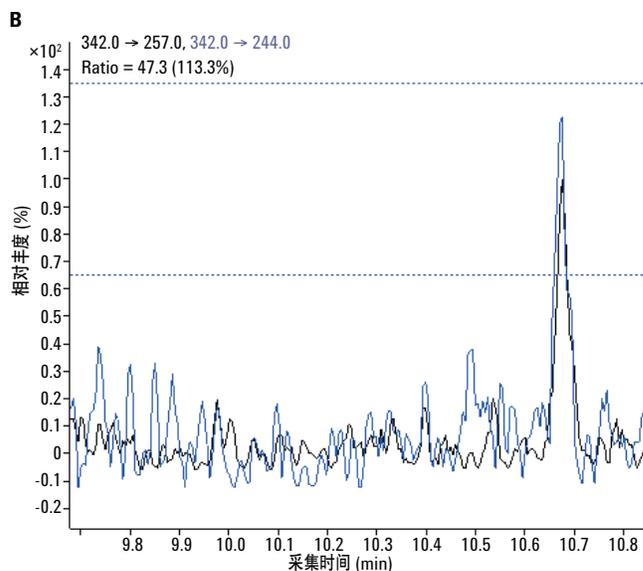
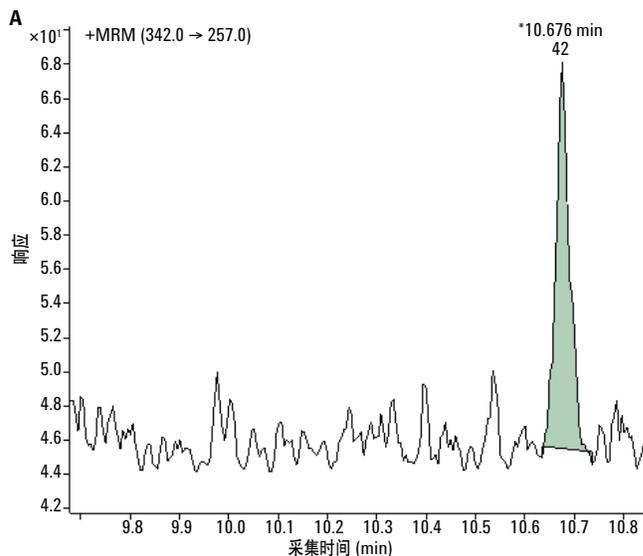


图 1. **A** 显示了定量 SRM 342  $\rightarrow$  257; **B** 显示了定性 transition SRM 342  $\rightarrow$  244。  
**B** 中的虚线代表了确认离子比率的容许不确定度。信噪比计算所对应的噪音区域为 10.4 至 10.6 min。

## 结论

Agilent 7696A 样品制备工作台可进行准确的样品、校准物或质控样品的制备，另外，它还自带衍生化功能，适用于自动化工作流程分析雌激素及其他内分泌干扰物。本应用简报阐述了自动化样品衍生化过程及其之后通过气相色谱-三重四极杆质谱进行分析的过程的有效性。我们在校准浓度范围内获得了优异的回收率和精度，所测定的 IDL 也与文献中报道的 MDL 值很好地吻合。

## 参考文献

1. Trinh T., *et al.* "Simultaneous determination of estrogenic and androgenic hormones in water by isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry". *J. Chrom A*, 1218 (2011) 1668–1676.
2. Wells G, Prest H, Russ CW. "Why use signal-to-noise as a measurement of MS performance when it is often meaningless" (既然通常无意义为何要用信噪比作为衡量 MS 性能的指标)，安捷伦应用简报 5990-8341EN。安捷伦科技（中国）有限公司，2011

## 更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，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。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013

中国印制

2013 年 1 月 9 日

5991-1695CHCN



**Agilent Technologies**