

大气压光电离源—液相色谱/飞行时间质谱的确认法用于河水、废弃流出物和污水中的雌性激素化合物的检测

应用摘要

环境分析

作者

Neil Cullum
Anglian Water Services
Central Laboratory
Hutchingsbrooke Business Park
Huntington, Cambs PE29 6FL

Paul Zavitsanos
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

性能改进的大气压光电离—液相色谱/飞行时间质谱仪 (APPI-LC/MS-TOF) 用于河水、废弃流出物和污水中的雌性激素化合物 (雌酮、雌二醇和乙炔基雌二醇) 的检测。这类化合物会导致雄性鱼的雌雄间性的变化, 甚至是浓度低至 **0.1 ng/L** 也会起作用。对包括样品制备, 仪器条件的分析方法经过了详细的讨论。河水和废弃流出物中雌激素的检测限 (LOD) 低于 **0.1 ng/L**, 相对标准偏差 (RSD) 小于 **15%**, 回收率大于 **90%**。

引言

近几年来, 雌性激素对水环境中影响越来越大, 因为这些化合物在浓度低至 **0.1 ng/L** 时, 都会导致雄性鱼

的雌雄间性的变化。所以, 需要一种具有灵敏度和选择性高的分析方法用于复杂样品中的雌性激素化合物的检测。

三类化合物被确定为会导致内分泌干扰的化合物, 即天然产生的雌酮 (E1), 雌二醇 (E2), 和第三类合成雌激素——乙炔基雌二醇 (EE2), 它具有最高的内分泌干扰作用。它们的结果参见图 1。

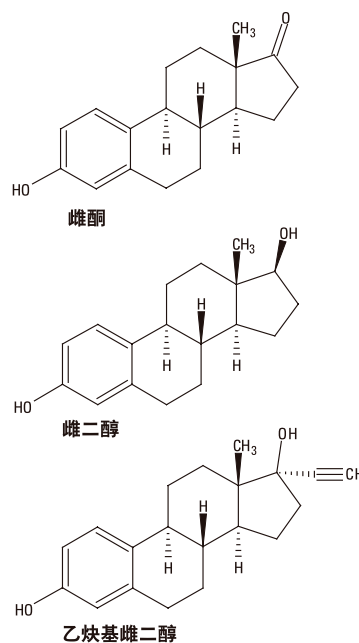


图 1. 雌酮、雌二醇和乙炔基雌二醇的结构



Agilent Technologies

按照传统的分析方法，这些化合物都是在与如七氟丁酸酐，五氟丙酸及许多硅烷化试剂衍生化之后，用 GC/MS 或 GC/MS/MS 检测的。这种方法样品前处理非常复杂，增加了样品制备的时间。

使用液质联用技术分析雌激素，是不需要衍生化的。然而，单四极杆液质技术在分析复杂基体样品中如此低含量的雌激素时，其选择性会有所限制。近来，飞行时间质谱（TOF）技术的发展大大提高了 TOF 的质量分辨率，一般在 250–300 amu 范围内，可以达到 0.04 amu 的精确度。这个范围适用于雌激素而且分辨率比四极杆质谱高至少一个数量级。更高的质量分辨率意味着降低样品或基质中非目标化合物的干扰。质量精度的提高可以得到化合物的精确质量数，因而得到更高的分析选择性 [1,2]。

本文介绍了三种雌激素的检测方法，包括样品的保护、提取，净化和用大气压光离子化—液相/飞行时间质谱仪分析的所有步骤。其检测限（LOD）小于 0.1 ng/L 以及对于实际样品的相对标准偏差（RSD）小于 15%，回收率高于 90%。

样品制备

在早期工作中，如果开发广泛而实用的分析方法，样品稳定性是一个必须考虑的因素之一。稳定性实验发现，保护剂可以满足要求。

样品制备中应先加入保护剂，然后经过三个制备步骤。所有的样品制备都是全自动的，几乎不需要操作者介入。

第一步是固相萃取浓缩的步骤。在这一步，800 毫升水样浓缩至 4 毫升。

第二步是用正相色谱梯度洗脱，然后自动收集相应的馏分。制备液相采用 Agilent 1100 制备液相系统，包括二元泵、控温多孔板自动进样器、柱温箱、可变波长检测器和控温馏分收集器。

第三步是采用体积排阻色谱（SEC），然后自动收集相应的馏分。

样品保护

本应用文献中的样品保护方法是在 1 升样品中加入 0.25 克硝酸铜和 1 毫升浓盐酸。样品被储存于 5 °C 的条件下（参见表 2）。

样品制备第一步

固相萃取柱（Baker）是添有 200 毫克 SDB1，体积是 3 毫升。所有的步骤都是在 Zymark AutoTrace 系统上全自动进行的。

每一个萃取柱序列用 5 毫升乙酸乙酯，3 毫升甲醇和 3 毫升色谱纯的水活化。

1. 800 毫升样品加入内标，然后以 10 mL/min 的流速通过已近活化的固相萃取柱。污水样品先用去离子水稀释 5 倍（即 200 毫升稀释至 1000 毫升），然后加入内标。
2. 每一个固相萃取柱用 3 毫升 60% 甲醇，然后用 3 毫升色谱纯的水序列清洗。
3. 固相萃取柱用空气干燥 40 分钟。
4. 2 × 1.5 毫升乙酸乙酯加入经空气干燥的每个固相萃取柱。收集洗脱液，最后再加入 1 毫升乙酸乙酯。

样品制备第二步

在这个步骤，采用正相色谱（NPC）和馏分收集。样品萃取液在 45 °C 下用氮气吹干，大约吹 30–45 分钟。然后溶解于 0.25 毫升的环己烷：异丙醇（95:5）的溶液中，然后再用第三步进一步净化。

液相色谱条件

色谱柱:	ZORBAX Cyano 4.6 mm x50 mm, 5 μm, 55 °C		
保护柱:	ZORBAX Cyano 4.6 mm x12.5 mm, 5 μm		
流动相 A:	环己烷		
流动相 B:	异丙醇		
梯度条件:	时间 (分钟)	A (%)	B (%)
	0—8.50	95	5
	8.55—10.4	75	25
	10.5—15	95	5
总分析时间:	15 分钟		
流速:	1 mL/min		
进样体积:	250 μL (抽样速度: 200 μL/min, 进样速度: 200 μL/min)		
检测波长:	280 nm		
馏分收集:	时间范围: 5.7—7.8 分钟 (根据每一分析再确认)		

样品制备第三步

在本步骤中，将采用体积排阻色谱（SEC）和馏分收集。从第二步来的样品吹干（45 °C），残留物再用 0.25 ml 的二氯甲烷溶解，然后用下列的条件净化：

液相色谱条件

色谱柱：	Polymer Labs Plgel 50A, 30 °C
流动相：	二氯甲烷
总分析时间：	13.5 分钟
流速：	1 mL/min
进样体积：	250 µL（抽样速度：125 µL/min, 进样速度：250 µL/min）
检测波长：	280 nm
馏分收集：	时间范围：8.9–12.2 分钟 （根据每一分析再确认）

收集的馏分经氮气吹干（45 °C），残留物再用 0.2 毫升的甲醇：水（10:90）溶解。最后，准备用液质分析。

定性分析

所有的分析都是在安捷伦的液相色谱/飞行时间系统上进行的。液相色谱/质谱包括安装大气压光离子源及 Agilent 1100 液相色谱仪，以反相模式分析。1100 液相色谱由微量真空脱气机，二元泵，柱温箱，多孔板自动进样器。另外一个单元泵用于输入参比离子的导入。

液相色谱/飞行时间质谱的分析条件

离子源：	大气压光离子源，负离子化模式
干燥气温度：	350 °C
干燥气流速：	8.0 L/min
汽化气温度：	475 °C
雾化器压力：	40 psig
毛细管电压：	3000 V
碎片裂解电压：	240 V
锥孔体电压：	60 V
扫描模式：	100–800 amu, 20000 (transients/scan), 0.67 (scan/sec)
参比标样：	100 mg/L, 嘌呤, 2 mL/L, 利血平, 1 mL/L
参比离子：	嘌呤：119.0363 amu 利血平：607.2661 amu
离子丰度：	40K–50K
在水中制备：	甲醇/5% 丙酮（50:50）
流速：	0.2 mL/min, 利用三通进样

提取离子流色谱图：	EIC 1：	雌酮 =
	269.15-269.16	269.1547 amu
	EIC 2：	雌二醇 =
	271.165-271.175	271.1703 amu
	EIC 3：	乙炔雌二醇 =
	295.165-295.175	295.1703 amu

分析型液相色谱分析条件

色谱柱:	Luna Phenyl Hexyl 2.0 mm x150 mm, 3.0 μm, 60 °C		
保护柱:	Luna Phenyl Propyl 2.0 mm x4.0 mm, 3.0 μm		
流动相 A:	色谱级的水		
流动相 B:	甲醇:丙酮 (95:5) (要求丙酮作为掺杂剂)		
梯度条件:	时间 (分钟)	A (%)	B (%)
	0—0.50	95	5
	0.50—1.00	80	20
	1.00—12.0	60	40
	12.0—14	20	80
	14.5	95	5
流速:	0.3 mL/min		
进样体积:	100 微升		

上进样量，其信/噪比在 200 到 400 之间。检测限约为 20-40 pg 之间。

在这个反相色谱图中，三个目标化合物全部是基线分离。

采用内标化合物进行标准校正曲线的建立。三个内标分别为氘代 4 雌酮，氘代 5 雌二醇和氘代 4 乙炔基雌二醇。内标的准确质量数分别为 273.1798，276.2017 和 299.1954。

利用四点建立校正曲线，浓度分别为 0，0.008，0.04 和 0.10 mg/L，所有标准溶液都含有浓度为 0.02 mg/L 的内标。校正标样最后相当于 0，2，10，25 ng/L，内标标样的浓度为 5 ng/L。

结果和讨论

校正标准溶液的制备

2 ng/L 标样的典型色谱图参见图 2。对于 800 pg 的柱

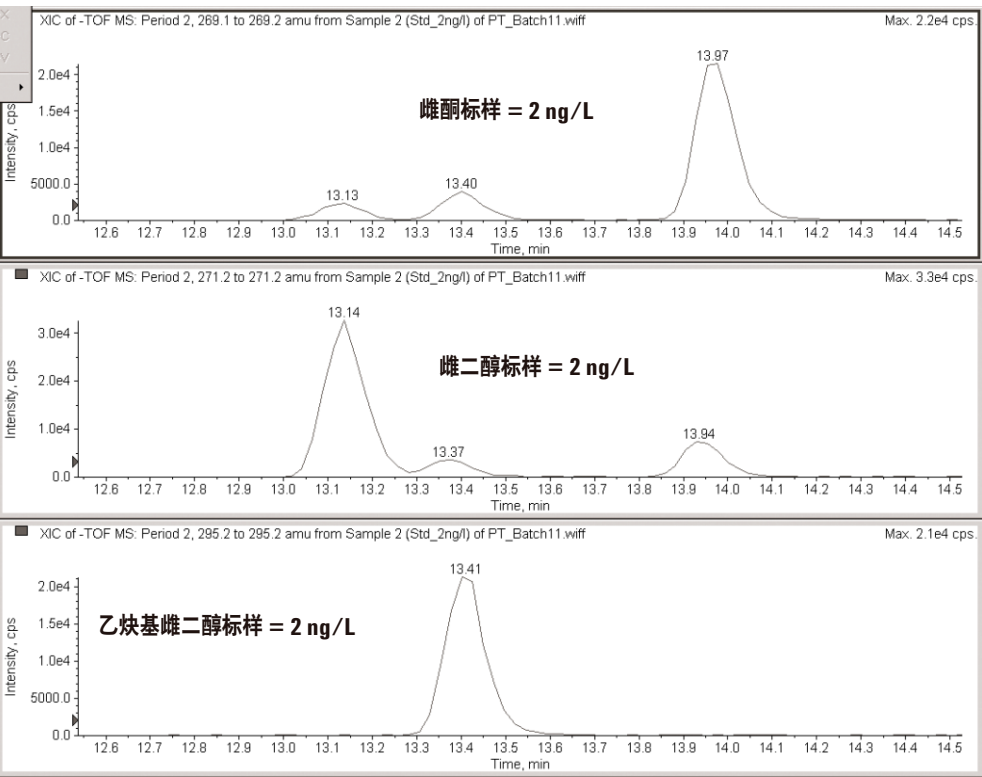


图 2. 浓度为 2 ng/L 标样的色谱图

雌酮的校正曲线见图 3。

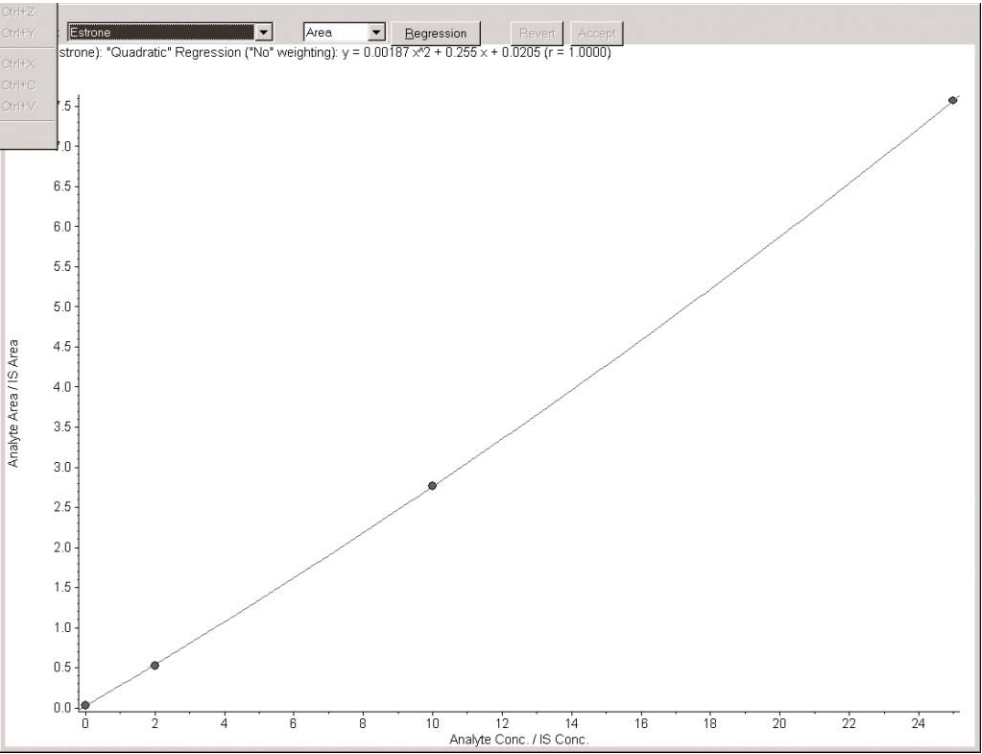


图 3. 雌酮的校正曲线。结果表明从 0–25 ng/L 的范围内呈线性

稳定性数据

对于获得高质量的数据的基本要求是要保证雌激素在样品基质中保证稳定。若没有样品保护剂，化合物可能会快速降解，尤其在废水中。结果参见表 1。

表 1. 在未加保护剂的样品基质中雌激素的稳定性数据

化合物	保存天数	室温下保存 (% 降解)	5 °C 下保存 (% 降解)
雌酮	2	40	<10
	5	60	20
	10	>90	70
雌二醇	2	80	40
	5	90	70
	10	>95	90
乙炔基雌二醇	2	<10	<10
	5	<10	<10
	10	50	<10

从表 1 的结果可以看出，在没有加入保护剂时，两天之后，雌激素有明显的降解，雌酮和雌二醇降解最明显，冷藏会降低化合物降解的速度。在有保护剂的条件下，化合物的常温降解速度大大减慢，加上冷藏时，

在 15 天内，只有低于 10% 的雌激素降解。数据结果参见表 2。

图 4-9 所示为提取离子流色谱图的例子。

表 2. 在加入保护剂条件下，雌激素在样品中的稳定性数据

化合物	保存天数	室温下保存 (% 降解)	5 °C 下保存 (% 降解)
雌酮	2	<10	<10
	5	<10	<10
	9	<10	<10
	15	20	<10
雌二醇	2	<10	<10
	5	<10	<10
	9	12	<10
	15	25	<10
乙炔基雌二醇	2	<10	<10
	5	<10	<10
	9	<10	<10
	15	20	<10

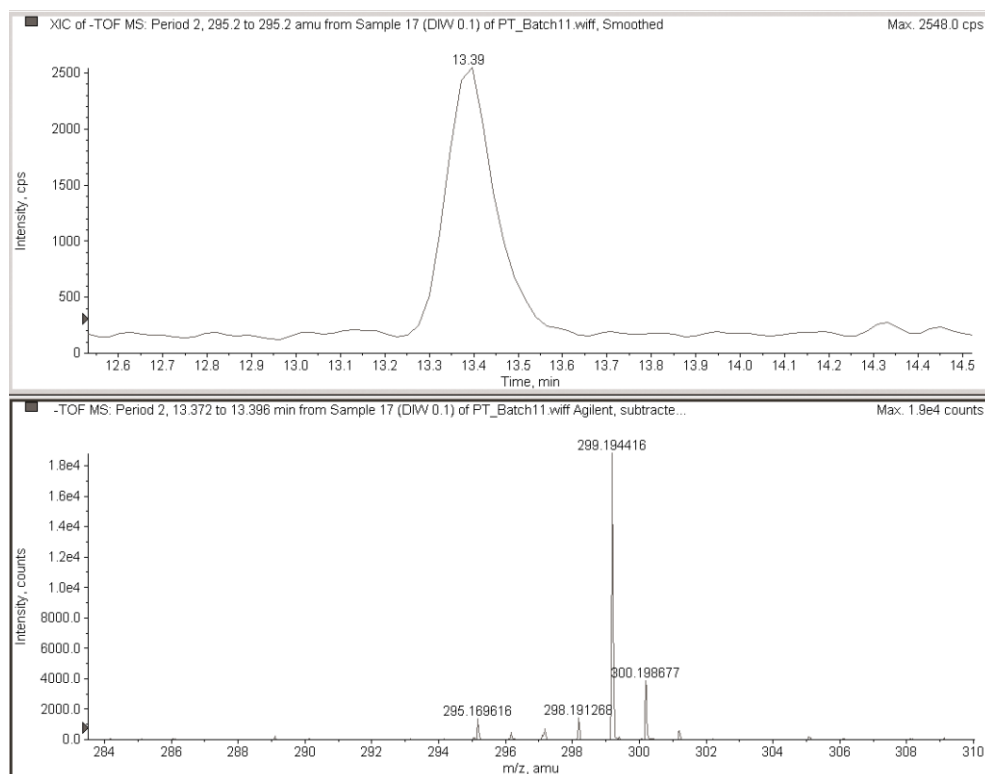


图 4. 乙炔基雌二醇在去离子水中的提取离子流图，添加浓度是 0.1 ng/L。质谱图还显示了氘代内标物的离子

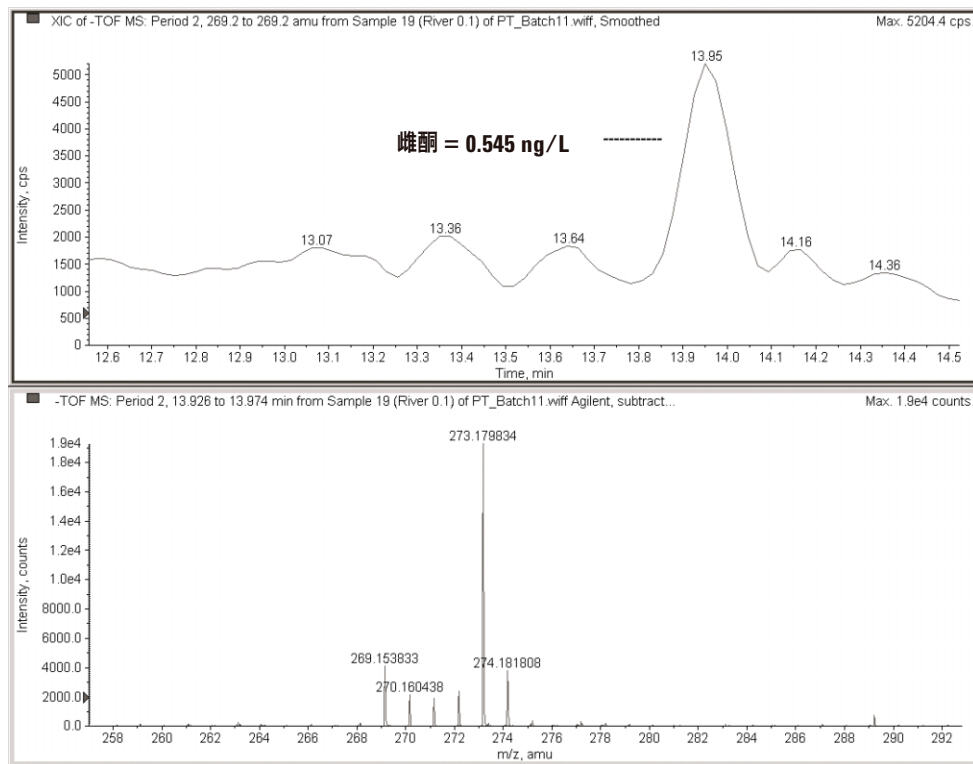


图 5. 在河水中浓度为 0.545 ng/L 雌酮的提取离子流图。质谱图也显示了氘代内标化合物的离子

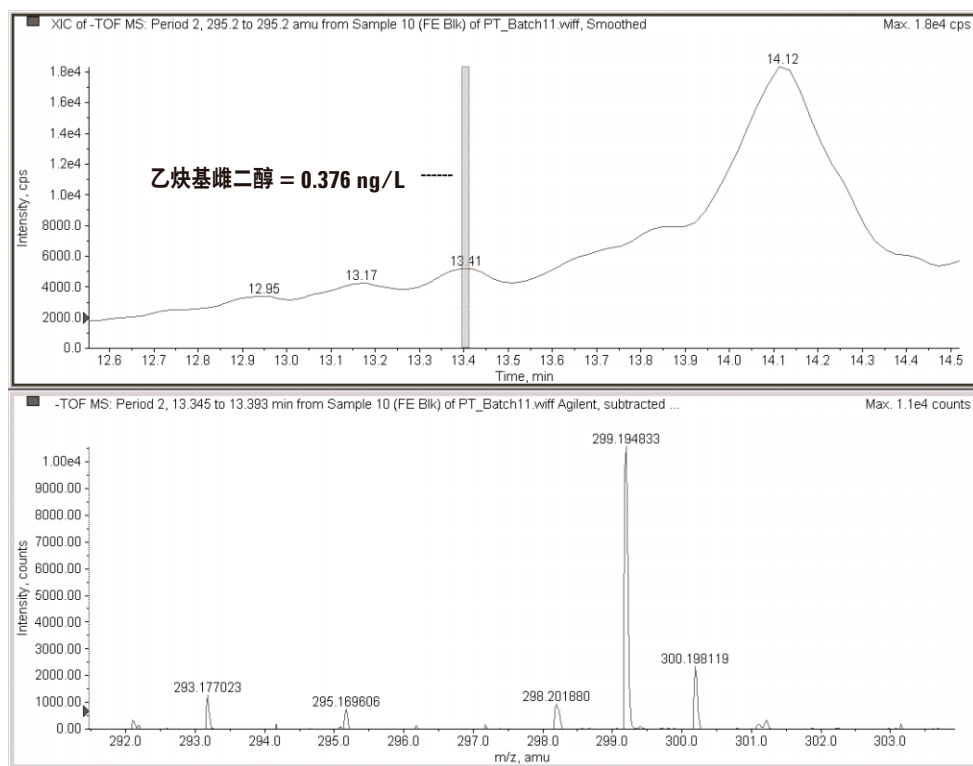


图 6. 在废液中浓度为 0.376 ng/L 乙炔基雌二醇的提取离子流图。质谱图也显示了氘代内标化合物的离子

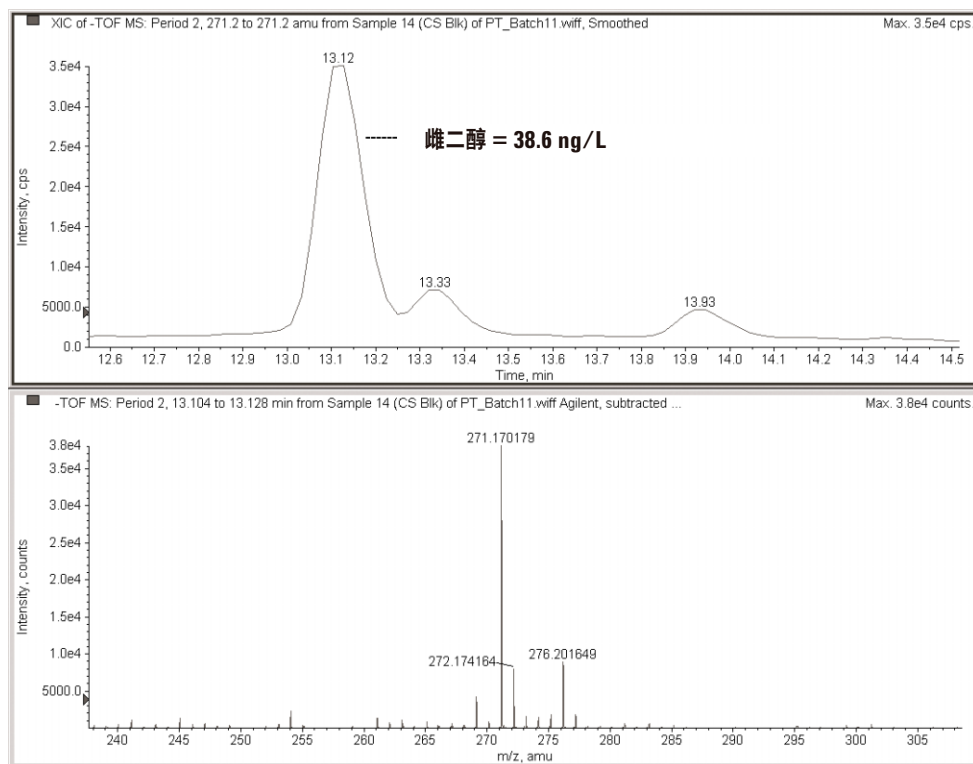


图 7. 在污水中浓度为 38.6 ng/L 雌二醇的提取离子流图。质谱图也显示了氘代内标化合物的离子

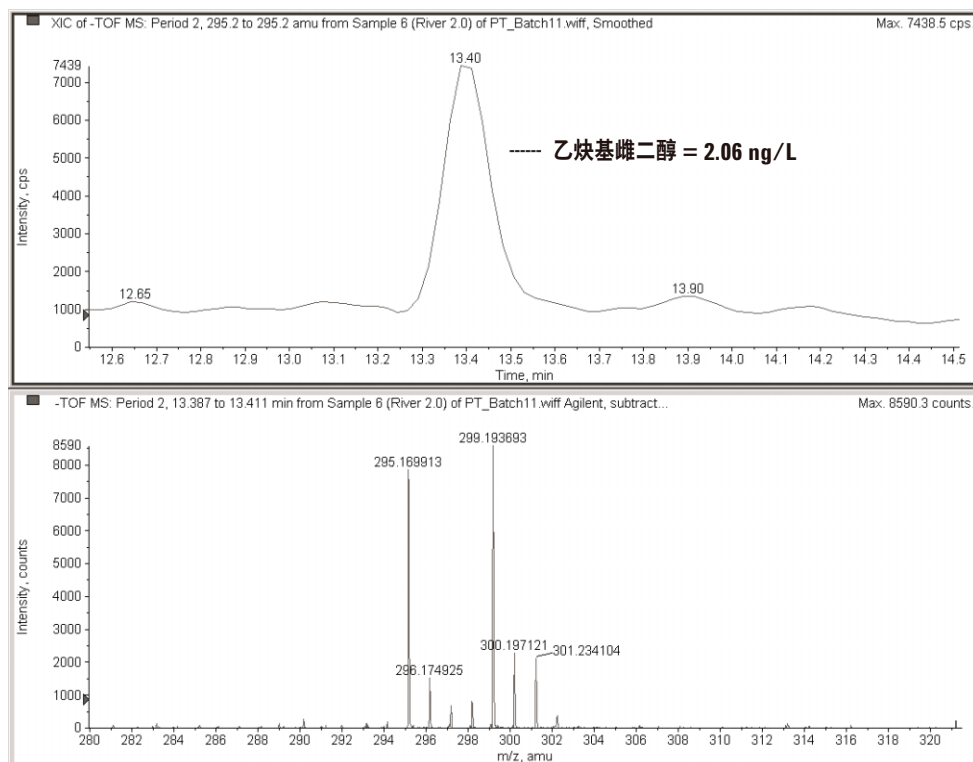


图 8. 在河水中浓度为 2.06 ng/L 乙炔基雌二醇的提取离子流图。质谱图也显示了氘代内标化合物的离子

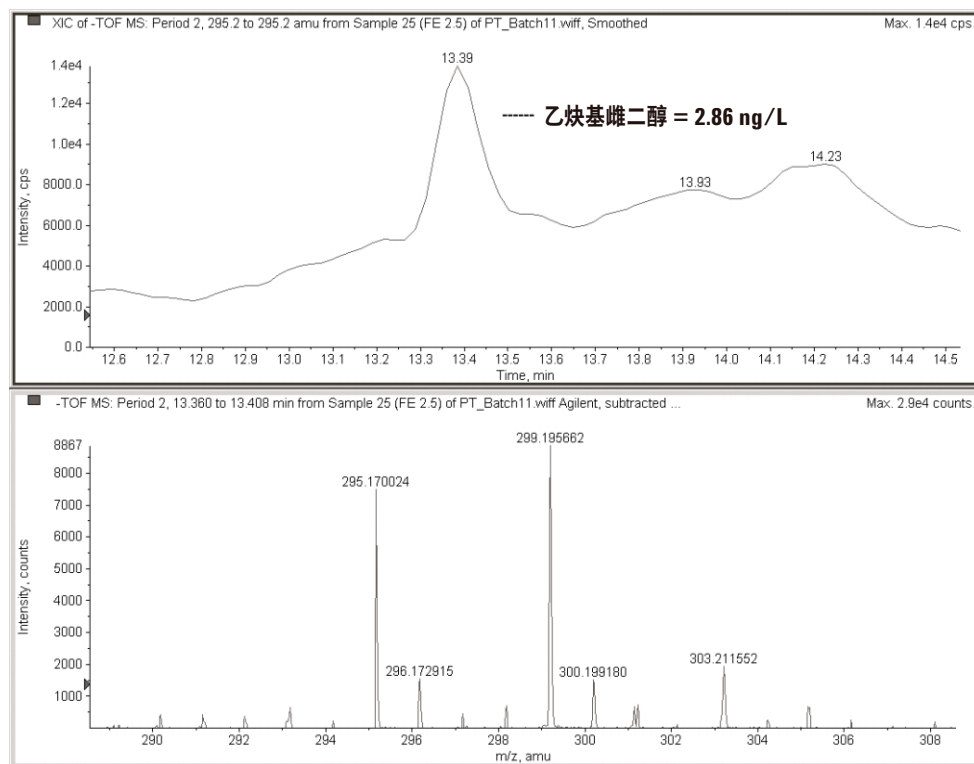


图 9. 在废液中浓度为 2.86 ng/L 乙炔基雌二醇的提取离子流图。质谱图也显示了氘代内标化合物的离子

回收率和精密度数据 (%RSD)

用 11 批次的样品进行分析方法的验证。样品包括添加 0.1, 2.0 或 20.0 ng/L 的去离子水, 河水, 另外添加 2.0 或 20.0 ng/L 的河水, 最后流出废液样品, 和另外添加 2.5 或 15 ng/L 最后流出废液样品, 污水和添加 25 ng/L 的污水样品, 详细地参见表 3。

表 3. 所有基体样品中雌激素的回收率和精密度

样品基体 + 加标浓度	雌酮 % 回收率和 % SD	雌二醇 % 回收率和 % SD	乙炔基雌二醇 % 回收率和 % SD
去离子水 + 0.1 ng/L	97.6 + 11.1	103.8 + 14.9	100.1 + 11.9
去离子水 + 2.0 ng/L	94.5 + 10.6	97.2 + 11.9	100.0 + 9.5
去离子水 + 20.0 ng/L	97.3 + 10.2	103.3 + 9.0	98.1 + 10.6
河水 + 2.0 ng/L	94.0 + 8.8	108.9 + 9.11	02.2 + 5.9
河水 + 20 ng/L	89.4 + 10.8	99.2 + 7.2	99.0 + 8.0
废弃流出物 + 2.5 ng/L	101.8 + 10.6	108.7 + 11.5	97.2 + 8.4
废弃流出物 + 15.0 ng/L	92.1 + 8.5	100.4 + 8.8	95.1 + 7.0
污水 + 25 ng/L	101.4 + 11.9	102.1 + 13.3	97.2 + 8.5

样品背景水平

	化合物	ng/L	%RSD
在河水中	雌酮	0.531	6.2
	雌二醇	0.312	9.5
	乙炔基雌二醇	0.174	8.2
在废弃流出物中	雌酮	5.44	13.7
	雌二醇	1.30	13.1
	乙炔基雌二醇	0.37	10.2
在污水中	雌酮	76.2	11.4
	雌二醇	40.6	18.6
	乙炔基雌二醇	2.5	10.1

检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

检出限 (LOD): 整个样品的标准偏差 $\times 4.65$

定量限 (LOQ): 精密度 $\times 2 +$ 偏差 (Bias)

表 4. 方法检出限和定量限

	去离子水 + 0.1 ng/L LOD	去离子水 + 0.1 ng/L LOQ	河水 LOD
雌酮 (ng/L)	0.0505	0.0241	0.0960
雌二醇 (ng/L)	0.0559	0.0348	0.137
乙炔基雌二醇 (ng/L)	0.0554	0.0240	0.0660

精确质量数测定和质谱图测定

可以通过测量各种基质样品中的雌激素的精确质量数来得到方法的选择性。将测量的质量数或绝对偏差与理论值比较。偏差越小, 可信度越高。质量偏差受样品基体背景及共流出峰的影响。对于测定的三个雌激素, 10 ppm 相当于 0.003 质量单位的误差。在负离子模式下, 测定的三个雌激素的精确质量数如下:

雌酮	269.1547 <i>m/z</i>
雌二醇	271.1703 <i>m/z</i>
乙炔基雌二醇	295.1703 <i>m/z</i>

表 5 所示为在各种基质样品中，测定的三个雌激素的质量误差。数据是来自方法验证的那批样品的数据。

结论

方法的目的是得到每一个雌激素的定量限（LOQ）。所有的结果总结于表 4 中。对于各个雌激素的定量限，乙炔基雌二醇，好于 0.03 ng/L，雌二醇，好于 0.3 ng/L 和雌酮，好于 1 ng/L。

回收率在 89.4–108.9% 之间，对于河水和最后流出物的精密度优于 15% RSD。对于测量的质量数精度，除了两个污水样品之外，所有的数据的质量精度均小于 5 ppm，所以结果具有很高的可信度。总的来说，此分析方法具有高灵敏度，高选择性的优点。

参考文献

1. D. McIntyre, “Effect of Resolution and Mass Accuracy on Empirical Formula Confirmation and Identification of Unknowns”. Agilent Technologies, publication 5989-1052EN www.agilent.com/chem
2. D. McIntyre, L. L. Lopez, D. L. Norwood, and K. B. McKellop, “Obtaining Routine High Mass Accuracy in a Walk Up Environment Using LC/MS TOF”. Agilent Technologies, publication 5989-1308EN www.agilent.com/chem

如需详细信息

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

表 5. 质量数的测量误差（ppm）

样品基质	雌酮	雌二醇	乙炔基雌二醇
去离子水 + 0.1 ng/L	-2.9860	-2.4109	0.1565
去离子水 + 0.1 ng/L	-3.7291	-3.1485	4.2220
去离子水 + 2 ng/L	-0.0137	0.1704	1.8505
去离子水 + 2 ng/L	0.3577	-1.3046	-1.5373
去离子水 + 20 ng/L	-0.0137	-1.3406	-1.5373
去离子水 + 20 ng/L	-0.7568	-0.9358	-1.1985
河水	-1.4998	0.5392	4.8995
河水	-3.7291	3.8581	4.8995
河水 + 2 ng/L	-0.0137	1.2767	-1.8761
河水 + 2 ng/L	-0.0137	0.1704	0.1565
河水 + 20 ng/L	0.3577	-1.3046	-2.5537
河水 + 20 ng/L	-1.1283	0.1704	-1.1985
废弃流出物	-0.7568	0.5392	1.1729
废弃流出物	-2.986	-2.4109	-0.8597
废弃流出物 + 2.5 ng/L	-1.1283	-3.8860	4.5608
废弃流出物 + 2.5 ng/L	-2.6144	-4.6236	-2.2149
废弃流出物 + 15 ng/L	-0.0137	-2.7797	-2.8925
废弃流出物 + 15 ng/L	-0.7568	-1.3046	-0.1822
污水	9.646	-0.5670	1.8505
污水	4.8161	-0.9358	-1.8761
污水 + 25 ng/L	8.5314	-1.6734	-1.8761
污水 + 25 ng/L	2.2154	-2.0421	-1.1985

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有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明和指标，如有更改，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2006

中国印刷
2006 年 6 月
5989-4858CHCN



Agilent Technologies