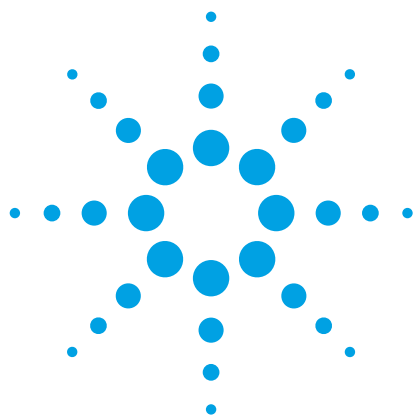




采用配置 iFunnel 技术的 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统优化检测废水中的类固醇

应用报告

环境

作者

Neil Cullum
Anglian Water Services
Huntingdon, England

摘要

通过优化在其它三重四极杆平台上开发的方法参数可以充分实现 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统更胜一筹的灵敏度。优化复杂基质样品废水中类固醇的分析方法可以获得低于 1 ng/L（万亿分之一）的灵敏度。

引言

全球范围内的药品消耗量很高，而且由于医疗卫生条件的改进和平均寿命的延长，这个数量将持续增加。大量的药物及其代谢物被人类排出体外，进入污水处理厂，这些物质在污水处理厂未被完全处理掉而最终留在了环境中。这些药物残留会对水陆生态环境产生负面影响。

美国地质调查局（USGS）最近的一项研究发现 80% 的溪流水样中存在化学污染物，而类固醇是最常检测到的一类化合物。这些类固醇在很低的浓度就能引起生物学反应，包括雄性鱼的雌性化。加拿大一项延续七年的全湖实验表明，某鱼种持续接触类固醇 17 α -炔雌醇中会导致湖中该鱼种几乎灭绝 [1]。这些类固醇也有可能进入食物链以及饮用水中。



Agilent Technologies

欧盟水框架指令（2000/60/EC）[2] 提倡合理利用水资源，包括长期减少废水污染物如类固醇排放到水环境中。指令的实施需要一个灵敏、准确且可靠的检测方法来支撑。

本文介绍了 2000/60/EC 指令中化学研究项目的部分内容，即采用配置 iFunnel 技术的 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统对类固醇的高灵敏度检测方法进行优化。该仪器可获得比以往仪器更低的检测限，从而使得在传统流速下就可以获得介摩级（zeptomole）的灵敏度，这使它成为重点药物分析应用的理想选择，如环境中类固醇的检测。虽然早先的质谱仪器已经开发了类固醇检测和定量分析的液质联用的方法，但是，为了获得最高的灵敏度还必须在 6490 三重四极杆液质联用系统上对已有的方法进行优化。使用优化的参数检测废水中几种类固醇化合物，可以实现废水中低于 1 ng/L（万亿分之一）的检测限。

实验部分

试剂和标准品

乙酸乙酯、乙腈、异丙醇、环己烷和甲醇均为 HPLC 级或 glass-distilled 级。盐酸（37%）和氨水（30%）均为分析纯。硝酸铜是通用级别试剂或者更高纯度。水为 HPLC 级或者 Elga 高纯水。聚苯乙烯二乙烯苯固相萃取（SPE）小柱（200 mg）购自 Baker 公司。GF/D 玻璃纤维滤纸购自 Whatman 公司（Kent, UK）。

雌酮、雌二醇和炔雌醇的乙腈溶液（浓度均为 100 mg/L）购自 QMX Laboratories 有限公司（Thaxted, UK）。取一定量的上述三种溶液分别加入到甲醇中制成浓度为 1.0 mg/L 的校正标。用甲醇/水（10:90）稀释成浓度为 1、2、5 和 10 µg/L 的校正混标。这些混标中还包含 2 µg/L 的内标溶液。

作为内标的氘代雌酮-D4、雌二醇-D5 和炔雌醇-D4 购自 QMX 实验室。各内标物先分别制成 100 mg/L 的乙腈溶液，再用甲醇稀释制成 1.0 mg/L 的内标混合溶液，并进一步稀释成 0.1 mg/L 的甲醇溶液。

仪器

通过配备 100 µL 定量环的 Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统与采用 iFunnel 技术的 6490 三重四极杆液质联用系统来实现方法优化和废水分析。通过连接于色谱柱和雾化器之间的三通阀上的另一个外部泵来实现柱后加入 0.1% 的氨水溶液。仪器条件见表 1。

样品采集、制备和净化

用 2 L 的棕色玻璃瓶采集样品，同时加入 2 mL 浓盐酸和 0.5 g 硝酸铜，并于 10 °C 以下储存。对此保存条件下样品的稳定性进行 14 天连续考察。样品提取后，提取物分析前在防爆冰箱中至少可保存 4 周。

每个样品在萃取之前都要用 GF/D 滤纸过滤。1 L 样品中加入 20 µL 内标混合溶液。100 mL 未经处理的污水样品中加入 900 mL 水和 20 µL 内标混合溶液。样品采用已依次用乙酸乙酯（5 mL）、甲醇（5 mL）和水（3 mL）活化过的 SPE 小柱进行萃取。萃取柱上加样 250 mL，并依次用 3 mL 60% 甲醇和 3 mL 水进行淋洗。萃取柱真空干燥 40 min 后，用 4 mL 的乙酸乙酯洗脱。样品瓶置于 45 °C 的加热块上，洗脱液随着空气流蒸发，最后残渣用 250 µL 的环己烷/异丙醇（95:5）复溶。

萃取物用正相色谱法进行纯化，收集保留时间 5.8-8.6 min 的洗脱液。色谱条件如下：仪器：Agilent 1100 系列液相色谱仪；色谱柱：安捷伦 ZORBAX Cyano 色谱柱（部件号 883952-705），4.6 x 150 mm，5 µm；柱温：55 °C；等度分离；流动相：环己烷/异丙醇（95:5）；流速：1 mL/min。样品瓶置于 45 °C 的加热块上，洗脱液随着空气流蒸发，残渣用 250 µL 的甲醇/水（90:10）复溶。最后得到终体积为 250 µL 的溶液，浓度相当于起始浓度的 1000 倍。因此，校准标准溶液相当于原始浓度为 1、2、5 和 10 ng/L。

表 1. LC 和 MS 仪器条件

LC 条件			
色谱柱	Agilent C-18 Eclipse Plus, 2.1 × 50 mm, 3.5 µm (部件号 959763-902)		
预柱	Luna C-18, 4.0 mm × 2.0 mm		
柱温	40 °C		
进样体积	25 µL		
流动相	A: 水		
	B: 乙腈		
运行时间	16.0 min		
流速	0.3 mL/min : 0.1 mL/min 柱后添加 0.1% 的氨水		
梯度程序	时间 (min)	% 流动相 A	% 流动相 B
	0	90	10
	0.5	60	40
	10.0	20	80
	10.2	0	100
	11.5	0	100
	11.6	90	10
MS 条件			
采集参数	ESI 模式, 负离子; 动态 MRM		
鞘气温度	300 °C		
鞘气流速	11 L/min		
干燥气温度	180 °C		
干燥气	氮气, 16 L/min		
雾化器压力	45 psig		
喷嘴电压	1500 V		
Vcap 电压	3000 V		
碰撞池加速电压	随着优化实验条件而改变		
EMV 增益	随着优化实验条件而改变		
高、低压离子漏斗电压	随着优化实验条件而改变		
扫描模式动态 MRM	Delta 增益 300 V		

分析参数

安捷伦三重四极杆液质联用系统分析参数见表 2。

表 2. 优化分析类固醇类化合物时所采用的时间段、离子对和碎裂电压

时间段	保留时间 (min)	化合物	母离子	子离子	CAV	碎裂电压	碰撞能量
1	8.0	雌二醇	271.0	145.0	2	380	50
1	8.0	雌二醇-D5	276.0	147.0	2	380	50
1	8.5	炔雌醇	295.0	145.0	2	380	52
1	8.5	炔雌醇-D4	299.0	147.0	2	380	52
1	8.8	雌酮	269.0	145.0	2	380	45
1	8.8	雌酮-D4	273.0	147.0	2	380	45

结果与讨论

分析参数的优化

虽然已经有用老型号的仪器分析类固醇的方法，但是为了充分利用采用 iFunnel 技术的安捷伦 6490 三重四极杆液质联用系统无可比拟的灵敏度，这些方法参数必须进行优化。为此以在 6460 三重四极杆液质联用系统上开发的方法为基础进行参数的优化。

碰撞池加速电压 (CAV) 是优化产物、检测和离子定量的关键参数。图 1 表明当加速电压由 5 V 变为 2 V 时，配制成标准校正溶液的 3 种类固醇物质的响应值显著增加。

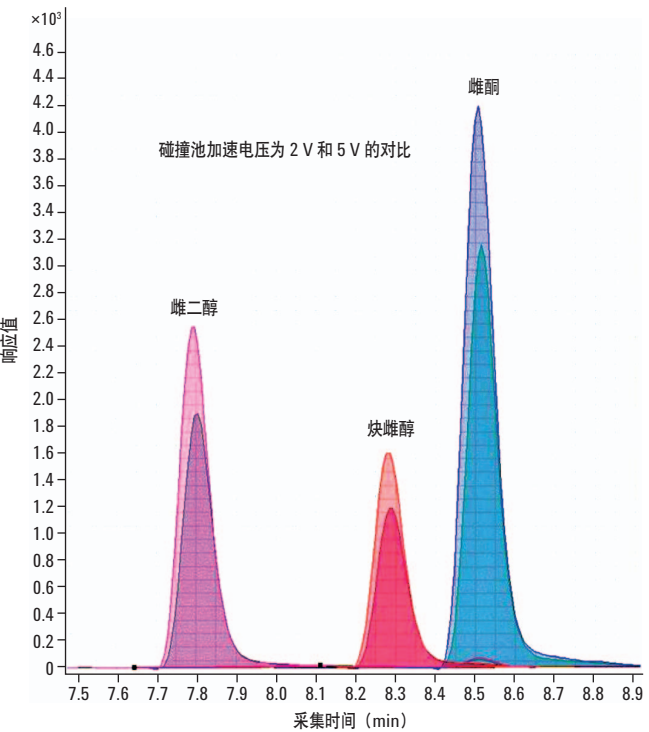


图 1. 碰撞池加速电压 (CAV) 从 5 V (较低的峰) 变为 2 V (较高的峰) 时对响应值的影响

倍增管电压 (即 EMV 增益) 是显著影响响应值的另一个参数。以 100 V 的步长从 100 V 递增至 400 V，整个范围内的响应值增加了 14 倍。当倍增管电压超过 400 V 时，响应值仍会继续增加，但信噪比保持不变甚至降低。实验发现最佳的电压值约为 200-300 V (图 2)。

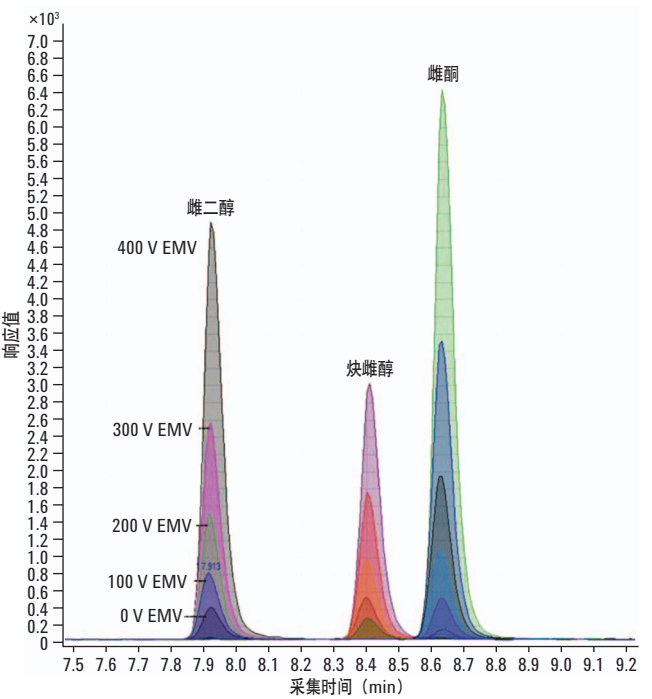


图 2. 随着倍增管电压 (EMV 增益) 的增加响应值显著增加

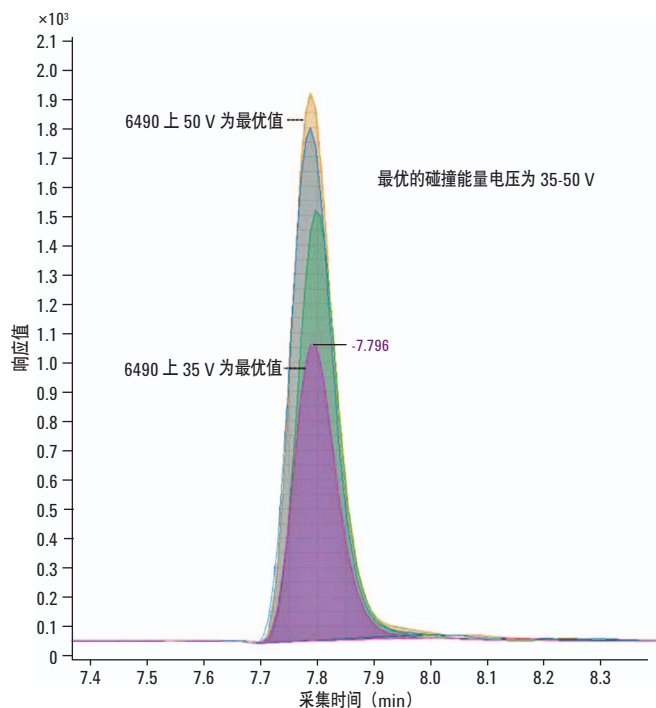


图 3. 与 6460 系统采用最优的碰撞能量 (35 V) 时的响应值相比, 安捷伦 6490 三重四极杆 LC/MS 系统采用最优的碰撞能量时雌二醇的检测响应值几乎增加了 2 倍

碰撞能量 (CE) 的优化对响应值最大化也很重要。雌二醇在 6460 系统方法上的最优碰撞能量是 35 V, 当碰撞能量在 6490 系统上以 5 V 的步长持续递增时, 雌二醇的响应值也不断增加, 达到 50 V 时响应值几乎增加了 2 倍 (图 3)。

安捷伦 6490 三重四极杆 LC/MS 系统提高灵敏度的关键因素之一是安捷伦独有的 iFunnel 技术, 它采用一种新型的双级离子漏斗组件。低压和高压电压在 6490 系统的仪器调整文件中均有默认设置。当然, 通过优化这两个电压可以显著提高灵敏度。例如, 把低压电压由默认的 60 V 变为 100 V 或者把高压 (高 RF) 电压由默认的 150 V 变为 160 V, 响应值都会提高 65% (图 4)。

在 6490 系统上, 方法采用所有这些优化参数得到的响应值与采用 6460 方法的最优参数得到的响应值相比, 前者是后者的 3 倍 (图 5)。采用这些优化参数可柱上检测到 0.1 pg 的雌酮 (图 6)、雌二醇和炔雌醇校正标准品 (样品浓度为 10 pg/L)。

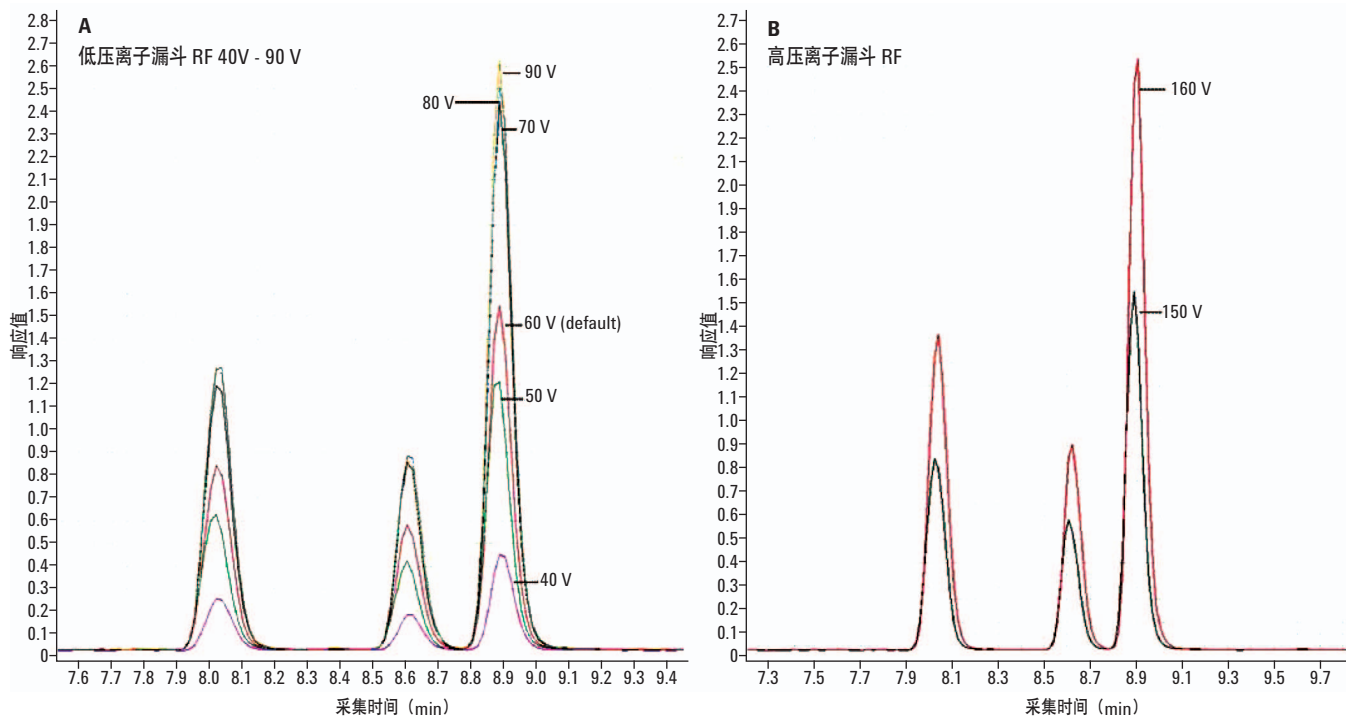


图 4. 分别优化安捷伦 6490 三重四极杆 LC/MS 系统的低压和高压离子漏斗电压, 3 种类固醇物质的响应值均会提高 65%

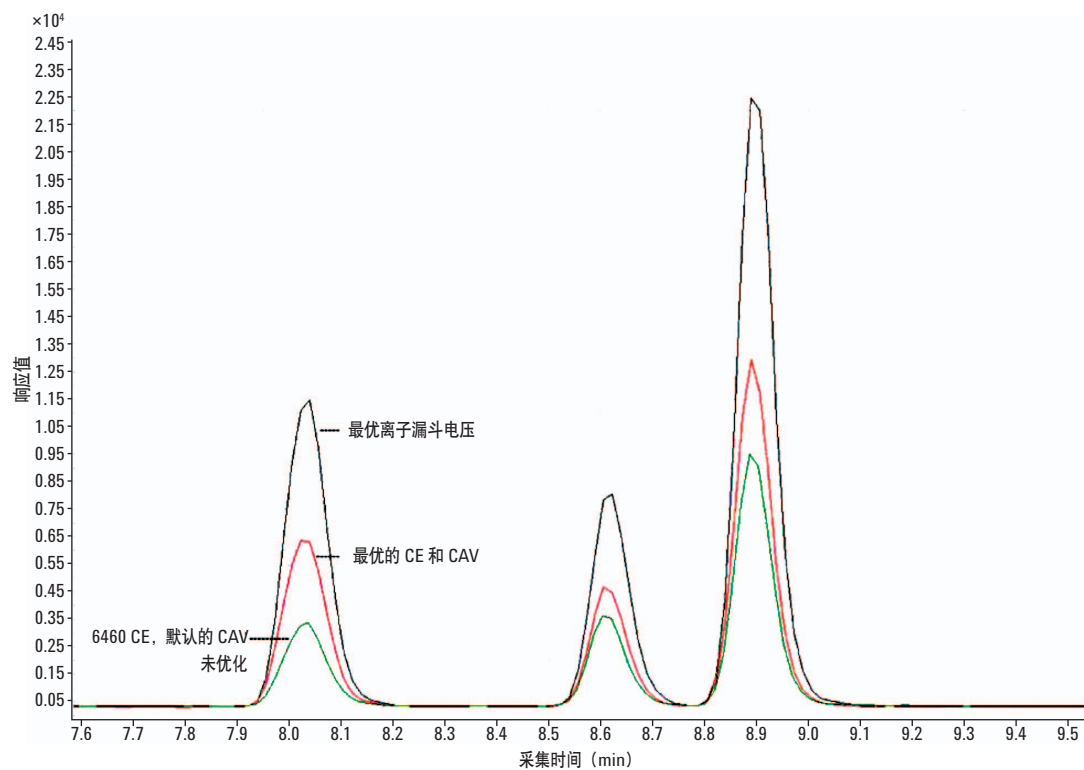


图 5. 展示了安捷伦 6490 三重四极杆 LC/MS 系统各个优化步骤的累积效应, 它使得这些类固醇化合物获得的响应值是安捷伦 6460 三重四极杆 LC/MS 系统方法采用最优参数时的 3 倍

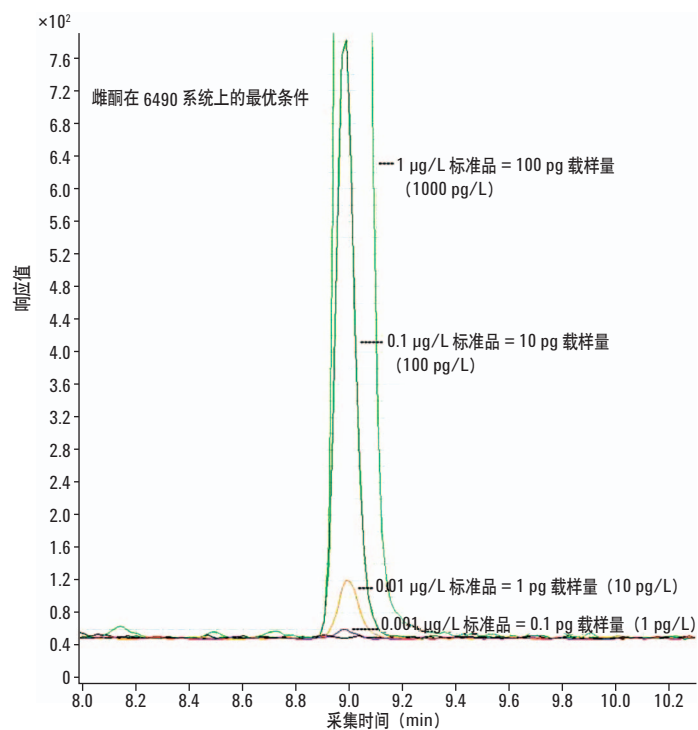


图 6. 使用优化的方法参数检测载样量 1 到 100 μg 的雌酮校正标准品

当使用优化的 MS 参数并以 0.1 mL/min 的流速柱后 加入 0.1% 氨水溶液时，类固醇的响应值会增加，与未添加氨水溶液时相比，提高了 3-4 倍（图 7）。

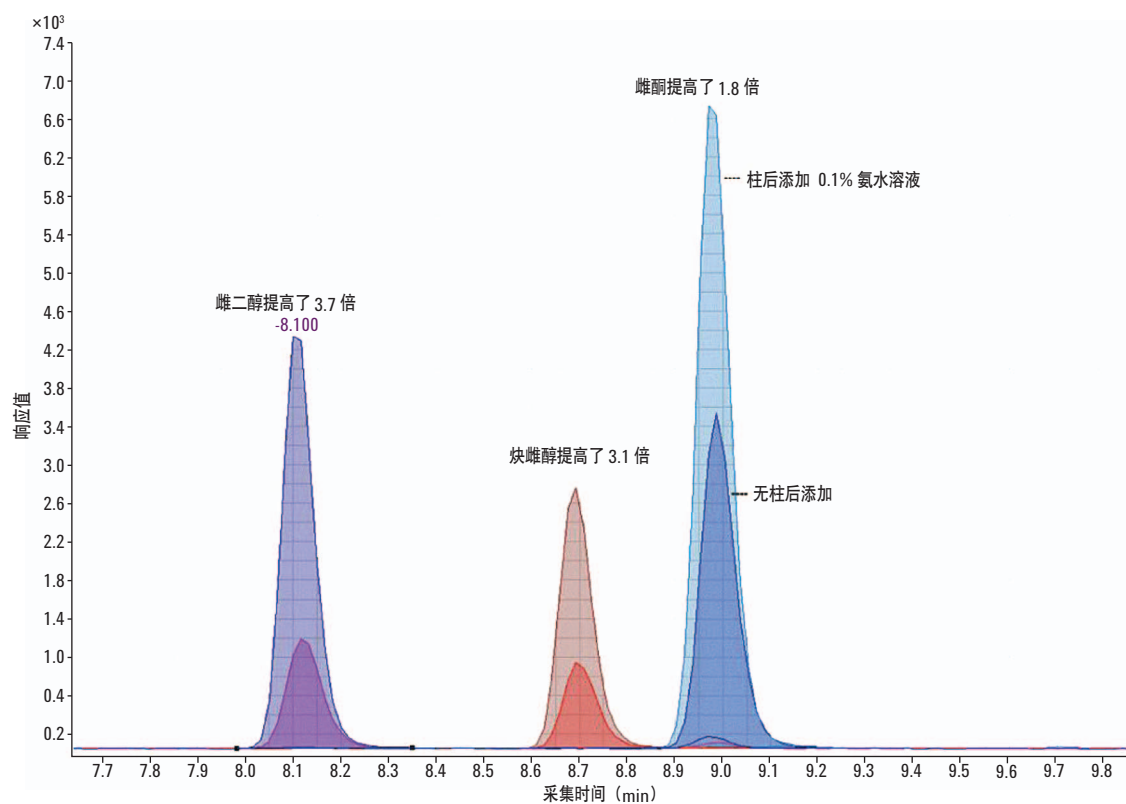


图 7. 柱后添加 0.1% 氨水溶液使 3 种被分析类固醇物质的响应值提高了近 4 倍

污水中类固醇的灵敏检测

该优化方法可检测到污水中低于百万亿分之一（ng/L）的类固醇。图 8 给出了分析含有 0.91 ng/L 炔雌醇的未经处理的污水样品的相关谱图，以及极好的校正曲线线性（ $R^2 > 0.9999$ ）。污水中 53.7 ng/L 的雌酮（图 9）和 44.5 ng/L 的雌二醇（图 10）都极易被检测到。定量分析这两种类固醇均展示了极好的线性， $R^2 > 0.9999$ 。

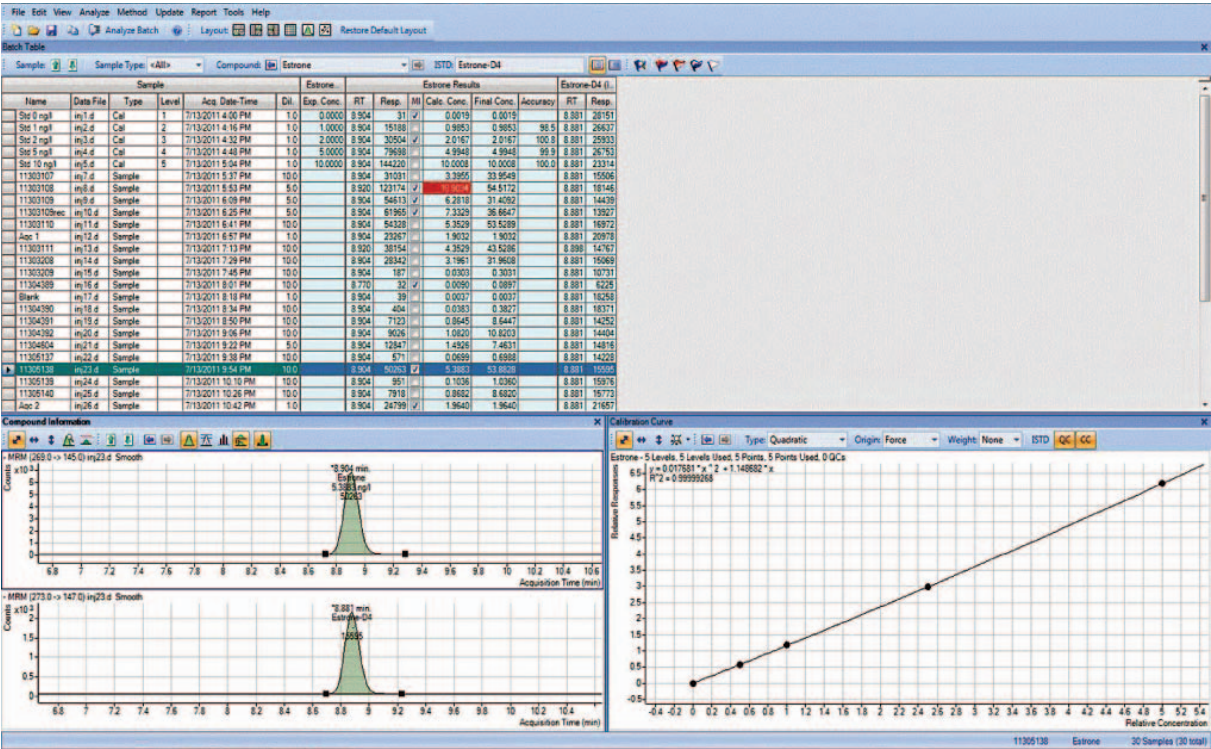


图 8. 展示了分析炔雌醇浓度为 0.91 ng/L 的污水样品时的 MRM 色谱图、内标色谱图以及校正曲线， $R^2 > 0.9999$

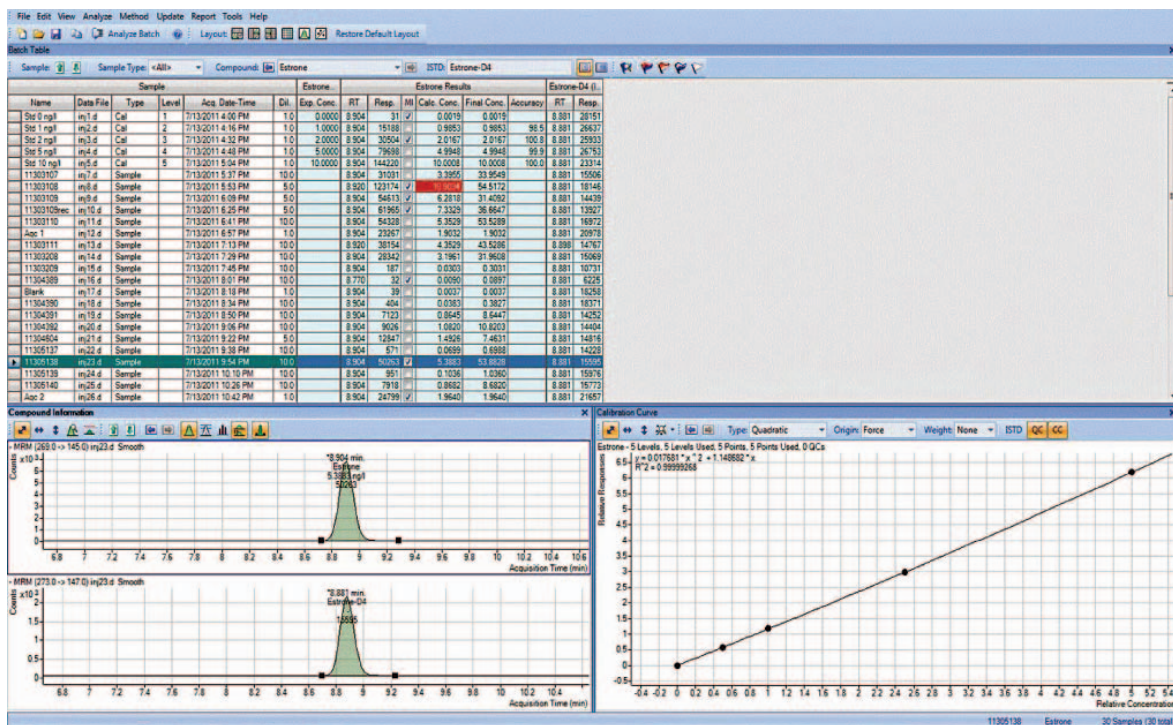


图 9. 展示了分析雌酮浓度为 53.7 ng/L 的污水样品时的 MRM 色谱图、内标色谱图以及校正曲线, $R^2 > 0.9999$

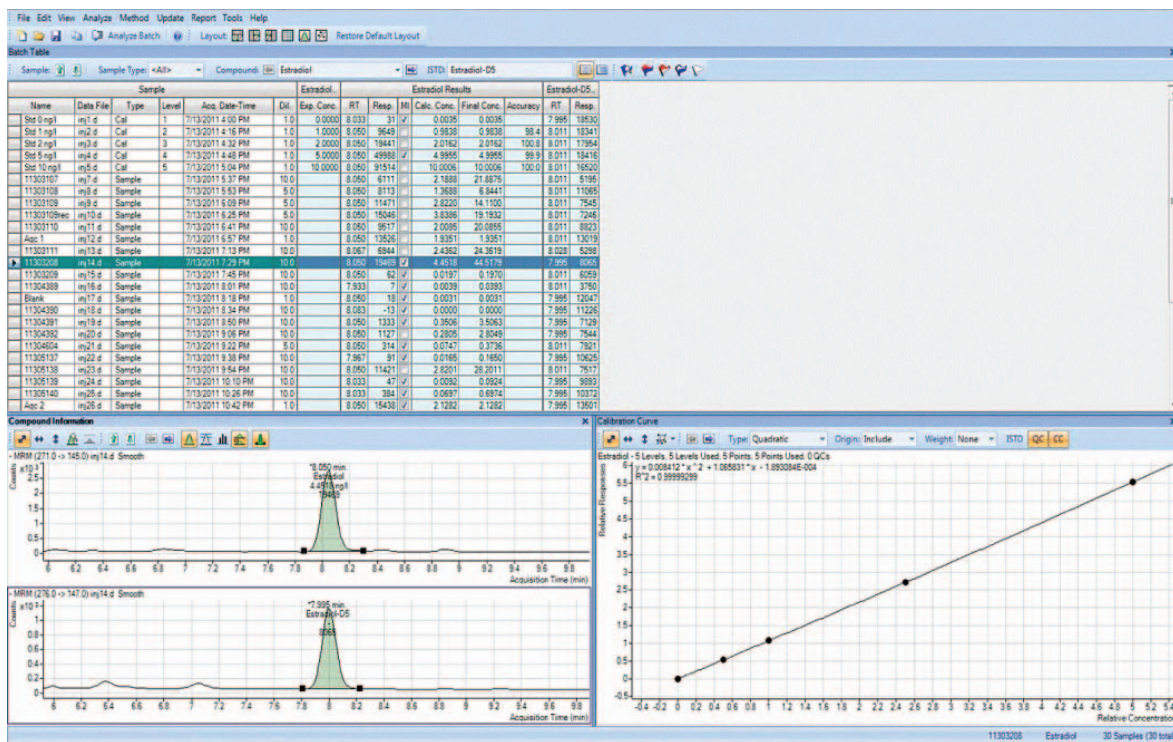


图 10. 展示了分析雌二醇浓度为 44.5 ng/L 的污水样品时的 MRM 色谱图、内标色谱图以及校正曲线, $R^2 > 0.9999$

结论

采用 iFunnel 技术的安捷伦 6490 三重四极杆 LC/MS 系统提供了极高的灵敏度，使其成为微量分析的理想选择。然而，与其它任何仪器一样，在老型号的 MS 仪器上开发的方法被应用到 6490 系统上时必须进行优化以最大限度地提高灵敏度。与使用在安捷伦 6460 三重四极杆 LC/MS 系统上开发的方法参数相比，这些优化参数能使类固醇的检测响应值提高 3 倍。该优化方法可使复杂基质的污水中类固醇的检测限低至 ng/L。

参考文献

1. K. A. Kidd, P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak, R. W. Flick, "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen.", Proc Natl Acad Sci U S A 104, 8897-8901 (2007).
2. Pollutants in Urban Waste Water and Sewage Sludge, http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/sludge_pollutants_xsum.pdf

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

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、说明和指标等如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012

2012 年 2 月 24 日，中国印刷

5990-9978CHCN



Agilent Technologies