

使用在线 SPE 富集对水中痕量有机污染物进行高灵敏度 LC/MS 定量分析

应用简报

环境

作者

Tarun Anumol 和 Shane Snyder
化学与环境工程系
BIO5 研究院
亚利桑那大学
亚利桑那州图森市
美国

Sheher Bano Mohsin
安捷伦科技公司
伊利诺伊州绍姆堡
美国

摘要

本实验开发出一种可快速、灵敏分析水中痕量有机化合物的在线 SPE 方法，该方法具有高重现性和高稳定性，且无需使用大体积样品和繁琐的萃取程序。方法报告限 (MRL) 范围为 0.10 ppt 至 15 ppt；回收率主要在 70% 至 130% 之间；大部分化合物的相对标准偏差 (RSD) 低于 10%。分析结果可与传统 SPE 方法所得到的结果相媲美。该方法还可为污水处理过程（包括进水）中的水样分析提供可靠结果。

前言

如今在水中可发现过去从未检测到的化学品，或者检测到的水平与预期可能存在显著差异 [1]。由于这些物质的存在、出现频率以及来源对人类健康和环境造成的风险尚不明确，因此通常称这些物质为引发关注的新型污染物 (CEC)。本实验在水中检测到多种痕量有机物的混合物，其中某些有机物的浓度达到 ng/L（万亿分之一，ppt）时即会影响水生生物。

已知一部分 CEC 是内分泌干扰物，而另外一部分则会影响糖皮质激素活性，长期暴露在低剂量 CEC 之下所带来的协同效应尚不明确。因此，EPA 制定了非受控污染物监控法规 (UCMR) 用于评估水源中 CEC 的潜在威胁。最新的 UCMR3 需要监控 2013 到 2015 年内的 30 种污染物。国家、实验室、公共给水系统都将参与评估监控、筛检调查和预筛选测试过程 [2]。



Agilent Technologies

监控水源中痕量污染物的难度之一在于，检测需要充足的样品量并经过充分的样品前处理才能完成。传统分析方法在实施仪器分析之前通常需要使用 1 L 水样，并对水样进行固相萃取，达到合适的萃取浓度。这些方法需要输送大量样品、花费大量的人力以及大量有机溶剂。

本应用简报描述了一种在线 SPE 痕量富集方法，该方法只需要极少的样品前处理，可显著减少所需的样品量。该方法能够稳定且灵敏地检出 ng/L 级痕量有机污染物。该 UHPLC/MS/MS 方法使用可重复利用的聚合物固相萃取柱，该固相萃取柱在线连接到 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统上，而此系统将与 Agilent 6460 LC/MS 三重四极杆系统联用。系统将同时使用正/负电喷雾离子源 (ESI)，能够节省大量时间。多反应监测 (MRM) 能够使 24 种有机污染物的 MRL 降至 0.10 ppt，且不高于 15 ppt。大部分有机物的回收率可与传统萃取技术相媲美，范围在 70% 至 130%，并且大部分化合物的相对标准偏差低于 10%。该方法非常稳定，已用于监测污水处理过程（从入水到氯化流出物）中这些污染物的含量。

实验部分

标样和试剂

除两种校准标样以外，其他试剂（最高纯度）均购自 Sigma Aldrich 公司。眠尔通购自 Cerilliant 公司，三氯生购自 Alfa Aesar 公司。校准标样溶液的制备：首先将固体纯品溶于甲醇，制备浓度为 500 µg/mL 的各种标样储备液。然后制备含所有目标分析物 (5 µg/mL) 的混合样。用 HPLC 级纯水稀释该储备液制成绘制校准曲线所需的浓度。

标记的替代内标物除 $^{13}\text{C}_4$ -全氟辛酸和 $^{13}\text{C}_4$ -全氟辛烷磺酸盐购自 Wellington 实验室；扑米酮- d_5 购自 Toronto Research Chemicals；吉非罗齐- d_6 购自 C/D/N Isotopes 以外，其他均购自剑桥同位素实验室（见表 1）。使用的所有溶剂均达到最高纯度，适用于液相色谱/质谱分析。农药级甲醇和乙腈购自 Burdick & Jackson，而 HPLC 级纯水则购自飞世尔公司。

表 1. 标记的替代内标物

化合物	化合物
阿特拉津- d_5	萘普生- $^{13}\text{C}_1\text{d}_3$
双酚 A- $^{13}\text{C}_{12}$	全氟辛酸- $^{13}\text{C}_4$
咖啡因- $^{13}\text{C}_3$	全氟丁酸- $^{13}\text{C}_4$
卡马西平- d_{10}	全氟辛烷磺酸盐- $^{13}\text{C}_4$
二甲基苯酰胺- d_6	扑米酮- d_5
氟西汀- d_5	磺胺甲基异恶唑- d_6
吉非罗齐- d_6	三氯卡班- $^{13}\text{C}_6$
布洛芬- d^3	三氯生- $^{13}\text{C}_{12}$
眠尔通- d_7	甲氧苄啶- d_3

仪器

系统将 Agilent 1200 Infinity 液相色谱系统模块与 Agilent 6460A 三重四极杆液/质联用系统进行联用。在线富集系统使用 Agilent 1200 系列四元泵、配用 900 µL 计量器和多次抽取功能的 Agilent 1200 自动进样器、可编程六通选择阀（阀 1）、12 通/2 位小柱选择阀（阀 2）以及 Agilent 1290 Infinity 液相色谱，如图 1 所示。

图 2 显示了上样和洗脱阀位置。表 2 和 3 列出了系统操作条件。

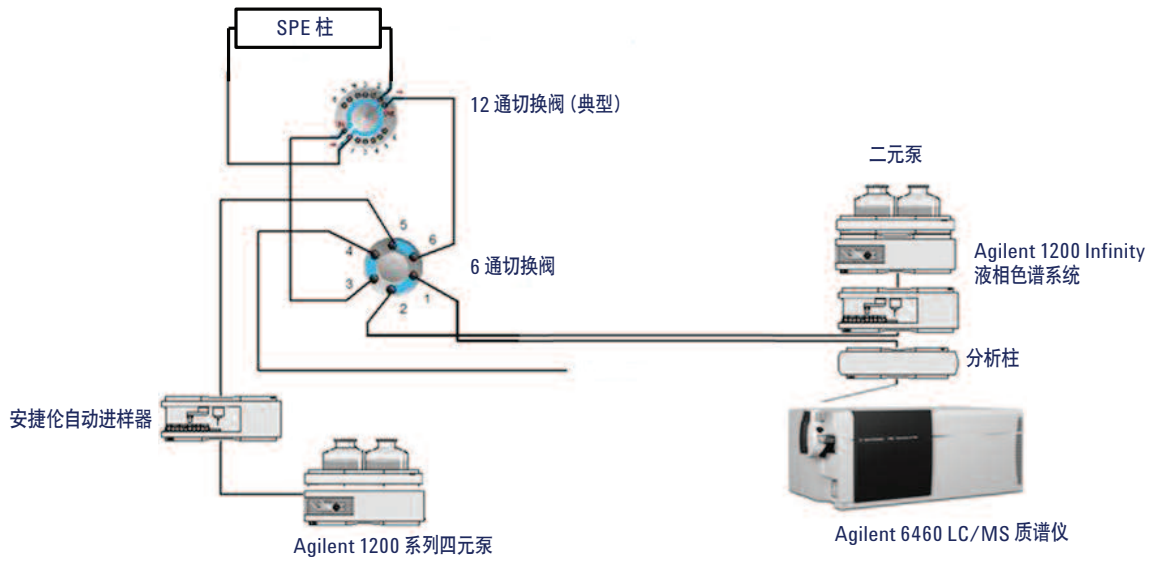


图 1. 在线 SPE LC/MS 系统配置

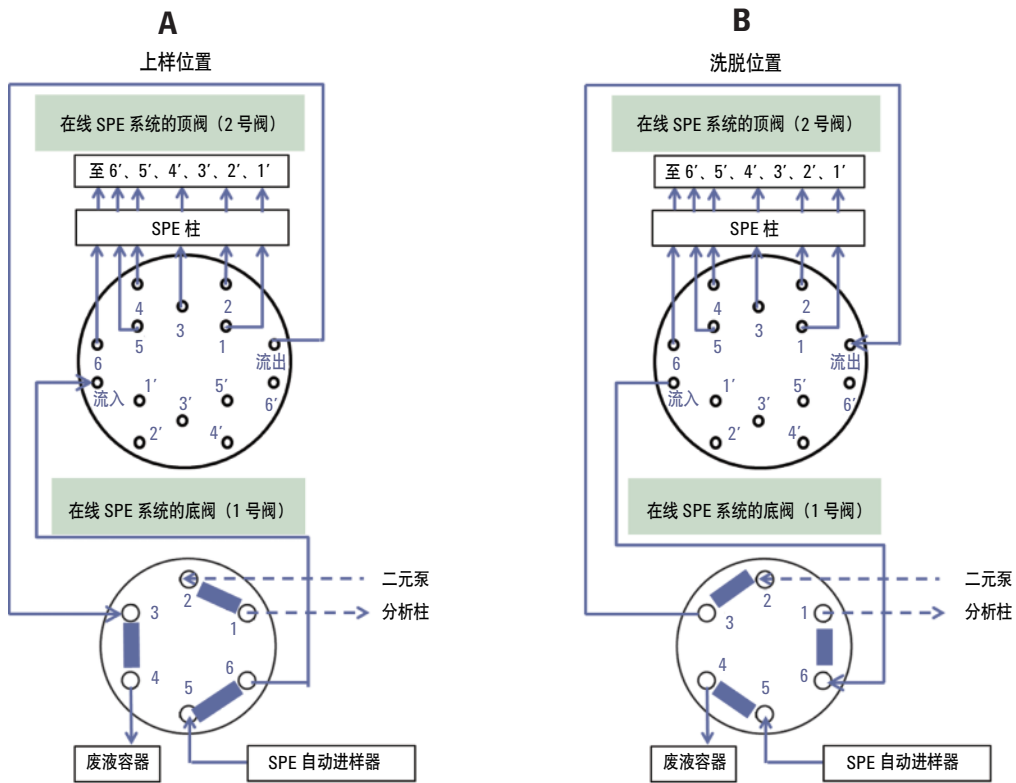


图 2. 在线 SPE 系统的上样 (A) 和洗脱 (B) 阀位置 (位置 1 和 2)

表 2. 在线 SPE 条件

进样																	
SPE 柱	PLRP-S, 15 µm																
温度	30 °C																
进样量	2 × 750 µL, 共 1.5 mL																
进样吸取速度	500 µL/min																
注射样品速度	200 µL/min																
吸取位置	0.5 mm																
四元泵																	
流速	0.7 mL/min																
流动相	A = 水 + 0.1% (v/v) 乙酸 B = 乙腈/异丙醇/甲醇 (1:1:1) C = 乙腈 + 0.1% (v/v) 乙酸																
SPE 色谱柱的洗脱梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>A</th> <th>B</th> <th>C</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95%</td> <td>0%</td> <td>5%</td> </tr> <tr> <td>5.5</td> <td>0%</td> <td>100%</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>11.1</td> <td>95%</td> <td>0%</td> <td>5%</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	A	B	C	0	95%	0%	5%	5.5	0%	100%	0%	11.1	95%	0%	5%
时间 (min)	A	B	C														
0	95%	0%	5%														
5.5	0%	100%	0%														
11.1	95%	0%	5%														
后运行时间: 2.9 min																	
阀位置	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>位置</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>1 (洗脱)</td> </tr> <tr> <td>5.5</td> <td>2 (上样)</td> </tr> <tr> <td>13.5</td> <td>1 (洗脱)</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	位置	1	1 (洗脱)	5.5	2 (上样)	13.5	1 (洗脱)								
时间 (min)	位置																
1	1 (洗脱)																
5.5	2 (上样)																
13.5	1 (洗脱)																
进样器程序	命令 吸取 (DRAW) 默认的样品量 使用默认偏移量以最大速度将默认量的样品注入 (EJECT) 针座 使用默认偏移量以默认速度吸取 (DRAW) 默认的样品量 将阀 (VALVE) 切换至“主通道” 等待 (WAIT) 3.5 min 远程控制 (REMOTE): 将远程控制线设置为“启动”																

样品前处理

污水样品取自污水处理厂, 分别采集处理过程中多个阶段的水样。在两天的采集时间内, 向样品中加入替代标样储备液制成最终浓度为 100 ppt 的样品。然后, 使用购自 GE Whatman 公司的 0.2 µm 注射式过滤器对样品进行过滤。最终制得两组样品: 一组为 1.5 mL 的样品, 另一组用 HPLC 级纯水稀释 5 倍 (300 µL 样品, 加 1200 µL 水) 制成分析物浓度均处于线性范围内的样品。按照前述方法 [2] 以使用 1 L 水样的传统 SPE 作为对照。

表 3. HPLC 和同步的 ESI- 与 ESI+ MS 仪器条件

HPLC 条件		
分析柱	Agilent Poroshell 120 EC 50 mm × 2.1 mm 直径 (部件号 699775-902)	
柱温	30 °C	
流动相	A = 水 + 0.1% (v/v) 乙酸 B = 乙腈, 0.1% (v/v) 乙酸	
运行时间	14 min + 1.5 min 后运行时间	
流速	0.7 mL/min	
SPE 色谱柱的洗脱梯度	时间 (min)	流动相
	0	5% B
	2	5% B
	3.5	25% B
	9	100% B
	11.5	5% B
	后运行时间: 1.5 min	
质谱条件		
采集参数	ESI 模式, 同时使用正/负电离; 动态多反应监测	
鞘气温度	375 °C	
鞘气流速	12 L/min	
干燥气温度	250 °C	
干燥气	11 L/min	
雾化器压力	45 psig	
喷嘴电压	正压 0 V; 负压 1500 V	
Vcap	正压 4000 V; 负压 3500 V	
Δ EMV	400 V	

分析参数

表 4 列出了 24 种分析物及其替代内标物的 MRM 离子对。

表 4. 多反应监测 (MRM) ESI 分析参数

化合物	保留时间	母离子	子离子	碎裂电压	碰撞能量	ESI 模式
阿替洛尔	3.1	267.1	190.1	130	15	正
			145	130	20	正
阿特拉津	6.4	218	176	140	15	正
			216	140	15	正
阿特拉津-d ₅	6.4	221	179	140	15	正
双酚 A	6.54	227	212	115	11	负
			133	115	19	负
双酚 A- ¹³ C ₁₂	6.54	239	224	115	11	负
咖啡因	4.3	195.1	138	104	16	正
			110.1	104	24	正
咖啡因- ¹³ C ₃	4.3	198.1	140	104		正
立痛定	6.06	237	194	120	15	正
			179	120	35	正
卡马西平-d ₁₀	6.54	247	204	120	15	正
二乙基苯酰胺	6.44	192	119	110	15	正
			91	110	30	正
二乙基苯酰胺-d ₆	6.44	198	119110	15		正
雌酮	6.91	269.2	183.1	120	30	负
			145.1	120	37	负
氟西汀	6.28	310	148	90	5	正
氟西汀-d ₅	6.28	315	153	90	5	正
吉非罗齐	7.93	249.2	121	75	6	负
吉非罗齐-d ₆	7.93	255	121	75	6	负
布洛芬	7.52	205	161	50	0	负
布洛芬-d ₃	7.52	208	164	50	0	负
眠尔通	5.4	219	158	70	5	正
			55	70	20	正
眠尔通-d ₇	5.4	226.1	165.1	70	5	正
萘普生	6.72	229	170	55	4	负
			169	55	24	负

表 4. 多反应监测 (MRM) ESI 分析参数 (续)

化合物	保留时间	母离子	子离子	碎裂电压	碰撞能量	ESI 模式
萘普生- ¹³ C ₁ d ₃	6.72	233	169	55	24	负
全氟丁酸	6.11	298.8	98.9	133	29	负
			80	133	45	负
全氟辛酸	6.72	412.9	368.9	86	5	负
			169	86	5	负
全氟辛酸- ¹³ C ₄	6.72	416.9	371.9	86	5	负
全氟辛烷磺酸盐	7.79	498.9	99	210	50	负
			80	210	50	负
全氟辛烷磺酸盐- ¹³ C ₄	7.79	502.9	99	210	50	负
扑米酮	4.85	219.3	162.1	70	9	正
			91.1	70	25	正
扑米酮-d ₅	4.82	224	167	70	9	正
西玛津	5.85	202.1	132	72	16	正
			68.1	72	36	正
新诺明	5.35	254	156	80	10	正
			92	80	30	正
磺胺甲基异恶唑-d ₆	5.35	260	162	80	10	正
磷酸三氯乙酯	7.1	285	222.8	95	10	正
磷酸三氯丙酯	7.13	327	99	72	16	正
			81	72	70	正
睾酮	6.5	289.2	97	100	25	正
三氯卡班	8.22	313	160	110	5	负
			126	110	25	负
三氯卡班- ¹³ C ₆	8.22	318.9	159.9	110	5	负
三氯生	8.33	289	37	75	5	负
			35	75	5	负
三氯生- ¹³ C ₁₂	8.33	299	35.1	75	8	负
甲氧苄啶	4.48	291	261	75	25	正
			230	75	25	正
甲氧苄啶-d ₃	4.48	294	264	75	25	正

结果与讨论

在线 SPE 操作流程

将水样（不含颗粒物）装入自动进样器的 2 mL 棕色玻璃瓶中。将样品（体积 1.5 mL）注入可重复利用的聚合物富集柱，该富集柱连接到输出 12 通/2 位色谱柱选择阀（顶阀，2 号阀，见图 2A）。总共可连接六根不同的小柱。水洗脱液导入废液瓶（见图 2A）。通常，大约 3 min 后完成上样。然后将底阀（1号阀）切换至洗脱位置（见图 2B），在高压梯度泵上启动洗脱梯度。

将捕集的分析物脱附到 Agilent Poroshell 120 EC 分析柱上，然后执行 LC/MS/MS 分析。然后使用溶剂 B（乙腈/异丙醇/甲醇）（1:1:1，见图 2B）清洗小柱。在分析运行过程中，随着 1 号阀返回至上样位置（图 2A），可根据需要在四元上样泵中使用溶剂 B 进一步清洗富集柱，然后将溶剂条件恢复为 100% 溶剂 A（水 + 0.1% 乙酸），准备分析下一个样品。

对于污水样品，每根可重复利用的 SPE 柱通常可执行至少 100 次进样。然后将 12 通阀（2 号阀，见图 2）切换至下一根小柱，用于下一进样序列。

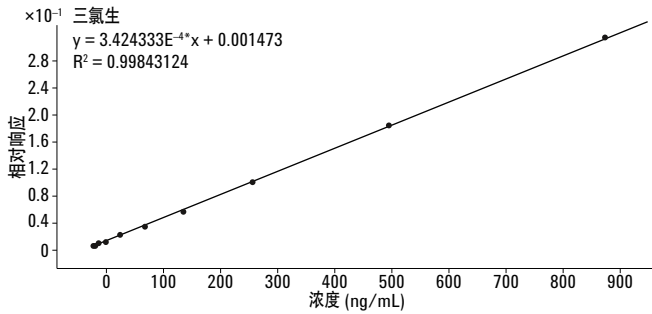
方法性能

本实验开发一种在线固相萃取 (SPE) LC/MS/MS 方法，可针对许多化合物使用多重转换和带标记的替代内标物，快速、灵敏且稳定地检测 24 种 ppt 级有机污染物（表 5）。方法的周期时间为 19 min，可在 3 至 880 ng/L (ppt) 的浓度范围内获取高度精确的校准曲线，线性拟合 R^2 值 > 0.995 （图 3）。

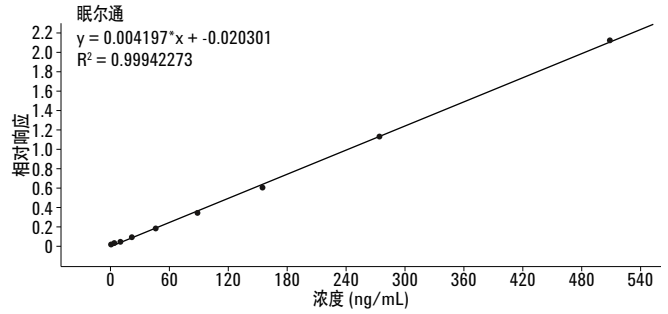
表 5. 目标分析物

化合物	类别
阿替洛尔	β -受体阻滞药
阿特拉津	除草剂
双酚 A	增塑剂
咖啡因	兴奋剂
立痛定	抗癫痫药
二乙基苯酰胺	驱虫剂
地尔硫卓	抗组胺药物
雌酮	激素
氟西汀	抗抑郁药
吉非罗齐	抗胆固醇药物
布洛芬	镇痛药
眠尔通	抗焦虑药物
萘普生	镇痛药
全氟丁酸	含氟表面活性剂
全氟辛酸	含氟表面活性剂
全氟辛烷磺酸盐	含氟表面活性剂
扑米酮	抗惊厥药物
西玛津	除草剂
新诺明	抗生素
磷酸三氯丙酯	阻燃剂
睾酮	雄激素
三氯卡班	抗生素
三氯生	抗生素
甲氧苄啶	抗生素

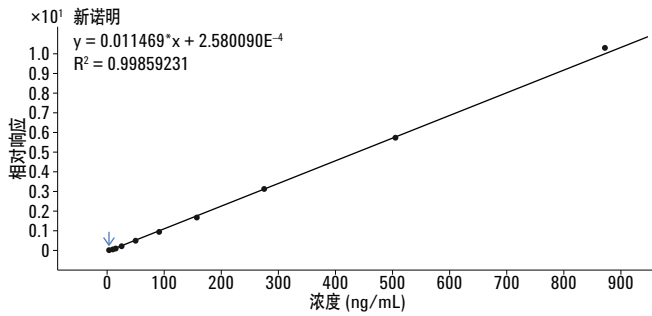
三氯生



眠尔通



新诺明



二乙基苯酰胺 3-880 ppt

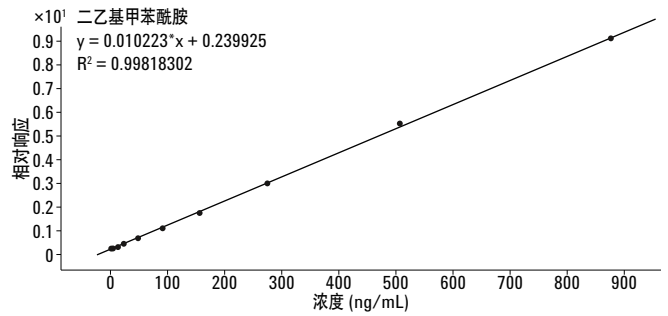


图 3. 四种分析物的典型校准曲线：三氯生和磺胺甲恶唑 (5-880 ppt)、眠尔通 (3-510 ppt) 和二乙基苯酰胺 (3-880 ppt)

使用加有不同浓度分析物标样的三等份 HPLC 级纯水测定各种分析物的 MRL，并将 MRL 定义为以相同浓度连续进样三次所得信噪比 (S/N) > 10 时的最低浓度。表 6 列出了所有 24 种分析物的 MRL。

采用加入 20 ppt 和 100 ppt 混合标样的超纯水样品测定回收率，低浓度加标样品和高浓度加标样品中 90% 以上的化合物的回收率处于 70% - 130% 范围内。大约 80% 的化合物在五次重复分析后得到的相对标准偏差 (RSD) 小于 10% (表 7)。

表 6. 目标分析物的 MRL (ppt)

分析物	MRL	分析物	MRL
阿替洛尔	15	眠尔通	0.5
阿特拉津	5	萘普生	10
双酚 A	10	全氟丁酸	10
咖啡因	0.5	全氟辛酸	10
立痛定	2.5	全氟辛烷磺酸盐	10
二乙基苯酰胺	0.1	扑米酮	15
雌酮	20	西玛津	1.5
氟西汀	10	新诺明	2.5
吉非罗齐	1.5	磷酸三氯丙酯	0.5
布洛芬	10	三氯卡班	1
甲氧苄啶	5	三氯生	5

粗体显示使用了替代标样的分析物。

表 7. 超纯水配制的两种浓度分析物的回收率*

化合物	20 ppt		100 ppt	
	回收率	RSD (%)	回收率	RSD (%)
阿替洛尔	89	0.8	85	6.2
咖啡因	92	2.8	96	1.4
甲氧苄啶	88	5.5	108	2.9
扑米酮	70	11.9	86	2.3
新诺明	107	2.3	100	0.9
眠尔通	115	1.5	103	0.7
西玛津	106	2.0	111	0.6
地尔硫卓	115	1.2	74	1.6
卡马西平	89	1.5	99	2.5
全氟丁酸	94	3.5	98	2.2
氟西汀	85	5.5	93	4.8
阿特拉津	86	2.3	99	1.9
二乙基甲苯酰胺	138	18.4	113	1.9
双酚 A	93	21.5	119	11.9
睾酮	115	9.3	94	2.2
萘普生	96	6.5	93	3.6
全氟辛酸	86	23.7	91	14.1
雌酮	99	13.3	152	19.9
磷酸三氯丙酯	NA	NA	80	15.8
布洛芬	100	7.4	98	3.7
全氟辛酸磺酸盐	125	4.2	117	3.6
吉非罗齐	99	6.7	111	2.3
三氯卡班	109	1.2	102	3.2
三氯生	91	3.8	100	2.4

*5 次重复
NA = 未分析

与传统 SPE 的对比

向取自科罗拉多河的地表水样中加入 200 ppt 目标分析物的混合标样，同时使用在线 SPE 方法和传统 SPE 方法进行分析。两种萃取方法所得到的回收率相当（表 8）。利用在线 SPE 得到的所有被检分析物（全氟辛酸除外）的回收率处于 80 % – 130 % 范围内。除扑米酮和三氯生外，两种方法得到的所有其他分析物的 RSD 均小于 10%。

表 8. 在线 SPE 方法与传统 SPE 方法的回收率对比

化合物	在线 SPE		常规 SPE	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
阿特拉津	108	0.8	94	1.9
双酚 A	87	8.1	97	11.6
咖啡因	105	5	95	4.3
卡马西平	114	6.4	117	1.3
二乙基甲苯酰胺	106	0.8	96	1.6
地尔硫卓	NA	NA	NA	NA
雌酮	NA	NA	NA	NA
氟西汀	129	5.2	97	2.3
吉非罗齐	122	4.8	93	2.7
布洛芬	105	3.2	92	5.7
眠尔通	97	0.6	74	1.5
萘普生	111	2.9	89	1.4
全氟丁酸	105	2.5	111	8
全氟辛酸	135	3.8	121	6.4
全氟辛酸磺酸盐	127	6.2	94	9
扑米酮	110	17.1	96	1.5
西玛津	81	0.9	73	2
新诺明	99	1.4	98	1.7
磷酸三氯丙酯	87	1.6	119	2.9
睾酮	NA	NA	42	2.4
三氯卡班	111	2	97	1.5
三氯生	82	10.3	112	2.8
甲氧苄啶	116	1.4	102	0.9

NA = 未分析

污水分析

在线 SPE 能够快速分析复杂水基质中的各种痕量有机污染物。使用在线 SPE 方法对处理过程中（从入水到氯化流出物）的污水样执行三次平行分析（表 9）。如果化合物的初始浓度超出了校准曲线的范围，则将样品稀释并重新运行。然后使用合适的替代内标物对所有浓度值均进行校正。表 9 显示，污水中部分有机物的初始浓度高于 1000 ng/L；少数有机物浓度高于 8000 ng/L；经污水处理后，其中一些有机物的浓度仍高于 500 ng/L。然而，某些浓度高于其 MRL 的化合物在结果中未被检出。

表 9. 污水多个处理阶段中有机污染物的浓度 (ppt) 测定

化合物	入水	二级出水	砂滤后	氯化出水
阿替洛尔	721	43	22	30
咖啡因	>8000	41	37	26
甲氧苄啶	2030	61	47	8
扑米酮	1676	514	443	670
新诺明	6552	3941	4223	62
眠尔通	693	618	636	612
西玛津	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
地尔硫卓	158	78	85	71
卡马西平	375	307	310	275
全氟丁酸	36	67	97	84
氟西汀	71	22	23	27
阿特拉津	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
二乙基甲苯酰胺	1383	150	93	156
双酚 A	310	20	30	<MRL
睾酮	45	<MRL	<MRL	<MRL
萘普生	>8000	180	117	<MRL
全氟辛酸	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
雌酮	<MRL	<MRL	<MRL	<MRL
磷酸三氯丙酯	1791	1338	1213	1299
布洛芬	>8000	88	55	55
全氟辛烷磺酸盐	148	<MRL	<MRL	<MRL
吉非罗齐	>8000	119	85	66
三氯卡班	765	25	32	11
三氯生	2227	73	124	97

结论

使用在线 SPE 能够灵敏且自动地分析水中的痕量有机物，同时节省大量的时间和人力。此外，该方法可为污水处理过程（包括入水）中的水样分析提供完全可靠的分析结果。本方法的 MRL 极低，范围为 0.10 ppt 至 15 ppt。回收率主要处于 70% 至 130% 的范围内，大部分化合物的 RSD 低于 10%，并且结果可与传统 SPE 方法所得到的结果相媲美。因此，自动化在线 SPE/HPLC/MS/MS 是应对各种水源中痕量有机污染物分析的理想选择，可实现高灵敏度的快速分析，提供高重现性、高稳定性的分析结果。

参考文献

1. Contaminants of Emerging Concern, <http://water.epa.gov/scitech/cec/>, accessed October 3, 2011
2. T. Anumol, S. Merel, S. Snyder, “使用 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统对水中日益被关注的新型污染物 (CEC) 进行高灵敏度 HPLC 分析”, 安捷伦应用简报 5991-1412CHCN

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。

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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013
2013 年 2 月 5 日，中国印刷
5991-1849CHCN