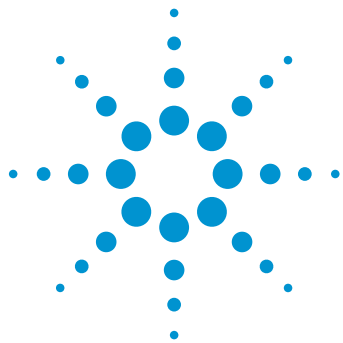




Comparação da análise de SPE on-line e injeção direta de estrogênios em nível de traço em água potável com os sistemas LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e Agilent 6490

A solução SPE on-line Agilent série 1200 Infinity para a mais alta sensibilidade

Nota de aplicação

Ambiental

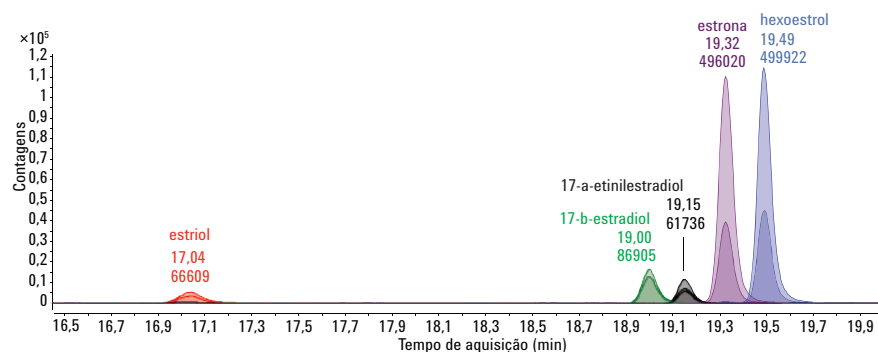
Autor

Bettina Schuhn
Agilent Technologies Inc.,
Waldbronn, Alemanha

Resumo

Esta nota de aplicação demonstra a sensibilidade aprimorada da solução SPE on-line Agilent série 1200 Infinity em comparação com métodos de injeção direta em um espectrômetro de massas de alta qualidade utilizado na rotina. A análise sensível de estrogênios em água potável é mostrada com quatro métodos diferentes aplicados em um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490, ambos acoplados a uma solução SPE on-line série 1200 Infinity.

O Flexible Cube Agilent 1290 Infinity, que é o módulo principal da solução SPE on-line série 1200 Infinity, oferece uma configuração altamente flexível e suporta injeção direta e SPE on-line, tudo em apenas um módulo. Com a opção de um kit de injeção de alto volume (4,5 mL), é possível alcançar sensibilidades menores que 1 ng/L com um espectrômetro de massas de rotina. Com um espectrômetro de massas de alta qualidade, foram observados limites de detecção de 0,02 ng/L.



Agilent Technologies

Introdução

Estrogênios naturais e sintéticos podem ser encontrados em águas ambientais em todo o mundo, devido ao alto consumo e excreção de medicamentos. Acredita-se que os estrogênios, como a estrona (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3) e o 17- α -etinilestradiol (EE2) sintético desempenhem um papel importante na interferência do sistema hormonal de organismos presentes na água, como peixes. As possíveis consequências para o homem ainda não foram elucidadas^{1,2}. Na Europa, a Water Framework Directive (WFD, 2000/60/EC)³ definiu uma lista de poluentes prioritários com efeitos prejudiciais ao meio ambiente. Os dois estrogênios propostos para inclusão nesta lista de substâncias prioritárias são: 17- β -estradiol e 17- α -etinilestradiol. As concentrações médias anuais propostas para águas superficiais são de 0,08 (E2) e 0,007 ng/L (EE2). Caso esses estrogênios sejam incluídos na lista, serão necessários métodos muito sensíveis de análise e detecção dos hormônios, especialmente de estrogênios, na água ambiental.

Para a análise sensível de estrogênios em matrizes ambientais, muitas vezes são necessárias etapas de extração e purificação¹. Na maioria dos casos, um método on-line de extração em fase sólida (SPE) é a abordagem mais simples para alcançar esse objetivo. A solução SPE on-line série 1200 Infinity reduz o tempo e o trabalho, além de melhorar a produtividade das amostras, já que toda a análise pode ser feita com um instrumento HPLC sem preparo de amostra off-line. Mesmo com um espectrômetro de massas de rotina, é possível alcançar alta sensibilidade, em níveis menores que 1 ng/L, com injeção de alto volume (4,5 mL) acoplada a diferentes espectrômetros de massas.

Nesta nota de aplicação, compostos relacionados ao estrogênio (naturais e sintéticos) foram analisados e quantificados com um processo de enriquecimento de extração em fase sólida on-line em dois espectrômetros de massas triplo quadrupolo sensíveis, um sistema de LC/MS triplo quadrupolo 6460 e um 6490. Os resultados foram comparados aos métodos de injeção direta.

Parte experimental e instrumentação

Todos os experimentos foram realizados com uma solução SPE on-line Agilent 1200 Infinity, que engloba:

- Bomba binária Agilent 1260 Infinity G1312B e uma placa LAN G1369C
- Amostrador automático padrão Agilent 1260 Infinity G1329B com cabeça de 900 μ L (G1313-60007) e um termostato Agilent 1290 Infinity G1330B
- Flexible cube Agilent 1290 Infinity G4227A com duas válvulas de 2 posições/10 portas
 - Kit inicial SPE on-line Agilent 1200 Infinity: G4742A (uma válvula de 2 posições/10 portas, 600 bar)
 - Kit de injeção direta SPE on-line Agilent 1200 Infinity: G4744A (uma válvula de 2 posições/10 portas, 600 bar)
- Acionador de válvula externa G1170A com válvula de 2 posições/6 portas G4231A e um loop de 5 mL (p/n G2260-68711)
- Compartimento de coluna termostatizado Agilent 1290 Infinity G1316C
- Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent G6460A com tecnologia Agilent Jet Stream
- Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent G6490A com tecnologia Jet Stream e tecnologia iFunnel Agilent

Colunas de extração

- 2 $\times$ Kit de hardware para colunas de guarda (p/n 820999-901) (como parte do G4742A)
- Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 $\times$ 12,5 mm, 5 μ m (p/n 820950-936)

Software

- Aquisição de dados Agilent MassHunter para espectrômetro de massas triplo quadrupolo, versão 06.00
- Software otimizador Agilent MassHunter, Versão 06.00
- Software otimizador da fonte e do iFunnel Agilent MassHunter, Versão 06.00
- Software qualitativo Agilent MassHunter, Versão 06.00
- Software quantitativo Agilent MassHunter, Versão 06.00

O método de LC/MS foi desenvolvido com base na nota de aplicação 5991-2473EN⁶.

Tabela 1. Método HPLC para injeção direta e SPE on-line.

	Injeção direta	SPE on-line
Volume de injeção	250 µL	4.500 µL
Cartucho de enriquecimento	–	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 12,5 mm, 5 µm (p/n 820950-936) 12,5 mm, 5 µm (p/n 820950-936)
Temperatura da coluna	30°C	30°C
Coluna	Agilent Poroshell 120 Fenil Hexil 2,1 × 50 mm, 2,7 µm (p/n 699775-912)	Agilent Poroshell 120 Fenil Hexil 3,0 × 50 mm, 2,7 µm (p/n 699975-312)
Fase móvel	A: água + fluoreto de amônio 1 mM B: metanol: acetonitrila (65:35)	A: água + fluoreto de amônio 1 mM B: metanol: acetonitrila (65:35)
Gradiente	0–0,5 minuto – 10% B, 0,5–5,5 minutos 10–100% B, 5,5–11 minutos 100% B	0–10,6 minutos – 10% B, 10,6–20 minutos 10–100% B, 20–24 minutos 100% B
Vazão	0,6 mL/min	0,6 mL/min

Configuração do sistema e princípios de operação

Esta nota de aplicação descreve a solução SPE on-line Agilent série 1200 Infinity, baseada no Flexible Cube 1290 Infinity com acionador de válvula externa adicional ao lado do Flexible Cube 1290 Infinity para uso com loops de injeção de grande volume (5 mL). Para obter mais informações sobre os perfis das tubulações e de fluxo, consulte a descrição técnica 5991-3173EN⁴.

O próprio Flexible Cube possui duas válvulas de 2 posições/10 portas para habilitar métodos de injeção direta e métodos SPE on-line com o uso alternado de duas colunas de extração⁵. Além disso, com a válvula de seleção de solventes no Flexible Cube 1290 Infinity, até três solventes podem ser utilizados para carregar e limpar os cartuchos SPE. Para a análise de estrogênios, uma coluna de guarda RP C-18 é perfeitamente adequada como uma fase SPE e pode ser usada para uma ampla variedade de concentrações, repetibilidade e precisão¹.

A Figura 1 apresenta uma visão geral esquemática do HPLC e do método SPE on-line.

Finalmente, o sistema foi acoplado a um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e 6490 para detecção e medições com sensibilidade aprimorada.

O procedimento de SPE on-line consistiu em três etapas (Figura 1):

1. Carregar e enriquecer a amostra no cartucho SPE (SPE 1)
2. Eluição do SPE 1 com fluxo de gradiente
3. Enxágue e recondicionamento do SPE 2 (da corrida anterior)

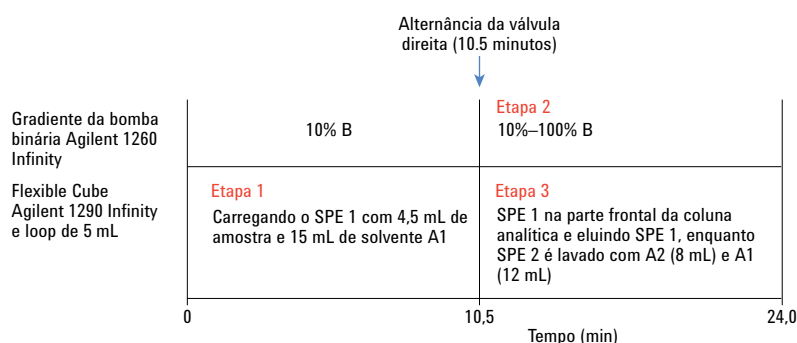


Figura 1. Esquema do método SPE on-line que inclui o Flexible Cube Agilent 1290 Infinity como uma bomba de carregamento e uma bomba binária Agilent 1260 Infinity para aplicar o gradiente e eluir os analitos dos cartuchos.

Flexible cube Agilent 1290 Infinity

- Válvula direita e esquerda:
Cabeça da válvula QuickChange
de 2 posições/10 portas
- Válvula de seleção de solventes:
solvente A1: água,
solvente A2: acetonitrila

Para carregar 4,5 mL no loop de 5 mL, um programa do injetor deve ser definido (Tabela 3)⁴.

As amostras foram medidas com os sistemas LC/MS triplo quadrupolo 6460 e 6490 em modo negativo. Os parâmetros da fonte Agilent Jet Stream foram otimizados com o otimizador da fonte e do iFunnel Agilent MassHunter (Tabela 4).

O método de monitoramento de reações múltiplas (MRM) do MS triplo quadrupolo foi desenvolvido com o software otimizador Agilent MassHunter. Injeções diretas foram usadas para todos os padrões de estrogênios (100 ng/μL). Para cada composto, duas transições de MRM foram otimizadas em relação à voltagem do fragmentador, voltagem do acelerador de cela e energia de colisão. A Tabela 5 mostra o conjunto de cinco estrogênios.

Tabela 2. Cronograma da bomba de pistão no Flexible Cube Agilent 1290 Infinity para o método SPE on-line.

Tempo	Função	Parâmetro
0	Bombeamento por volume	Bombear 15 mL, fluxo: 1,5 mL/min Canal A1 (água)
10,5	Mudança de posição da válvula direita	Aumentar a posição da válvula (válvula seletora)
10,6	Bombeamento por tempo	Bombear 8 mL, fluxo: 1,5 mL/min Canal A2 (ACN)
16	Bombeamento por tempo	Bombear 12 mL, fluxo: 1,5 mL/min Canal A1 (água)

Tabela 3. Programa do injetor.

Programa do injetor para carregar 4,5 mL

Repetir quatro vezes:

1. Aspirar 900 μL (velocidade de aspiração 900 μL/min, velocidade de ejeção 900 μL/min)
2. Lavagem da agulha
3. Ejetar para o assento
4. Fim da repetição
5. Aspirar 900 μL
6. Injetar

Tabela 4. Parâmetros de fonte de íons para ionização negativa no Agilent Jet Stream para o sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e o sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490.

Parâmetros	Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460	Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490
Nozzle	500 V	0 V
Capilar	3.000 V	3.500 V
Temperatura do gás de focalização	400°C	375°C
Fluxo do Sheath gas	12 L/min	12 L/min
Temperatura do gás de secagem	350°C	125°C
Fluxo do gás de secagem	12 L/min	16 L/min
Nebulizador	45 psi	40 psi
Δ EMV	600 V	300 V

Tabela 5. Cinco estrogênios listados com massa, fórmula, precursores, íons produtos e polaridade.

Esteróide	Massa (g/mol)	Fórmula	Íon precursor (m/z)	Íon produto 1 e 2 (m/z)	Polaridade
Estrona (estrogênio natural)	270,3	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	269,1	145,2/142,9	negativa
17-β-Estradiol (estrogênio natural)	273,3	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	271,2	183,2/145,1	negativa
17-α-Etinilestradiol (estrogênio sintético)	296,4	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	295,4	145/143	negativa
Estriol (estrogênio natural)	288,3	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	287,3	143/171,2	negativa
Hexoestrol (estrogênio sintético)	270	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	269,15	134/119,2	negativa

Amostras

A água da torneira foi contaminada com estrogênios em diferentes níveis de calibração.

Sete padrões de calibração de estrogênios para injeção direta no sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460, variando de 2,5 a 200 ng/L (2,5, 5, 10, 25, 50, 100 e 200 ng/L) cada, foram preparados pela diluição apropriada da solução estoque (200 ng/L). Uma curva de calibração com sete níveis para o método SPE on-line no sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460 foi preparada na faixa de 0,1 a 50 ng/L (0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 25 e 50 ng/L).

Uma curva de calibração de sete níveis foi feita para o sistema de LC/MS triplo quadrupolo 6490 de alta sensibilidade e injeção direta, na faixa de 0,5 a 50 ng/L (0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, e 50 ng/L). Para o método SPE on-line, a curva de calibração foi preparada na faixa de 0,05 a 25 ng/L (0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e 25 ng/L).

Produtos químicos

Foram utilizados apenas solventes grau LC/MS. A acetonitrila e o metanol foram adquiridos da Merck, Alemanha. A água ultrapura foi obtida de um sistema Milli-Q Integral equipado com LC-Pak Polisher e um cartucho de membrana de ponto de 0,22- μ m (Millipak). O fluoreto de amônio foi adquirido da Sigma Aldrich, St. Louis, EUA.

Todos os padrões de estrogênio foram adquiridos do Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanha, a uma concentração de 100 ng/ μ L em acetonitrila.

Resultados e discussão

Linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O SPE on-line, assim como os métodos de injeção direta, mostram linearidade excelente para todos os estrogênios em diferentes faixas de concentração com o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460 e 6490.

Para o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460, a linearidade foi medida em água potável com adição para o método de injeção direta na faixa de 2,5 a 200 ng/L

e para o método SPE on-line na faixa de 0,1 a 50 ng/L. Na Figura 2, são mostradas as curvas de calibração do 17- β -estradiol e 17- α -etinilestradiol para o método SPE on-line.

Os métodos de injeção direta e SPE on-line foram transferidos do sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460 para um triplo quadrupolo com maior sensibilidade. O sistema LC/MS triplo quadrupolo 6490 inclui tecnologia iFunnel para análise em nível de traços e a mais alta sensibilidade.

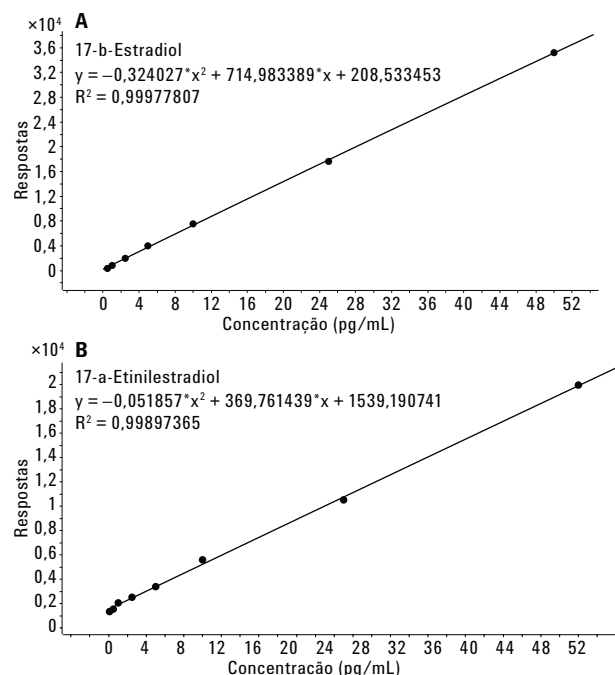


Figura 2. Curva de calibração (1–50 ng/L) para o 17- β -estradiol (A) e 17- α -etinilestradiol (0,1–50 ng/L) (B) com R^2 de 0,999 medido com um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e SPE online.

As curvas de calibração foram preparadas em água potável na faixa de 0,05 a 25 ng/L (8 níveis) para todos os estrogênios. A Figura 3 mostra que as curvas de calibração de estrona, hexoestrol e estriol apresentam boa linearidade em uma ampla faixa de calibração.

A Tabela 6 resume o R^2 para os métodos de injeção direta e SPE on-line realizados no sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460 e 6490 em diferentes faixas de concentração.

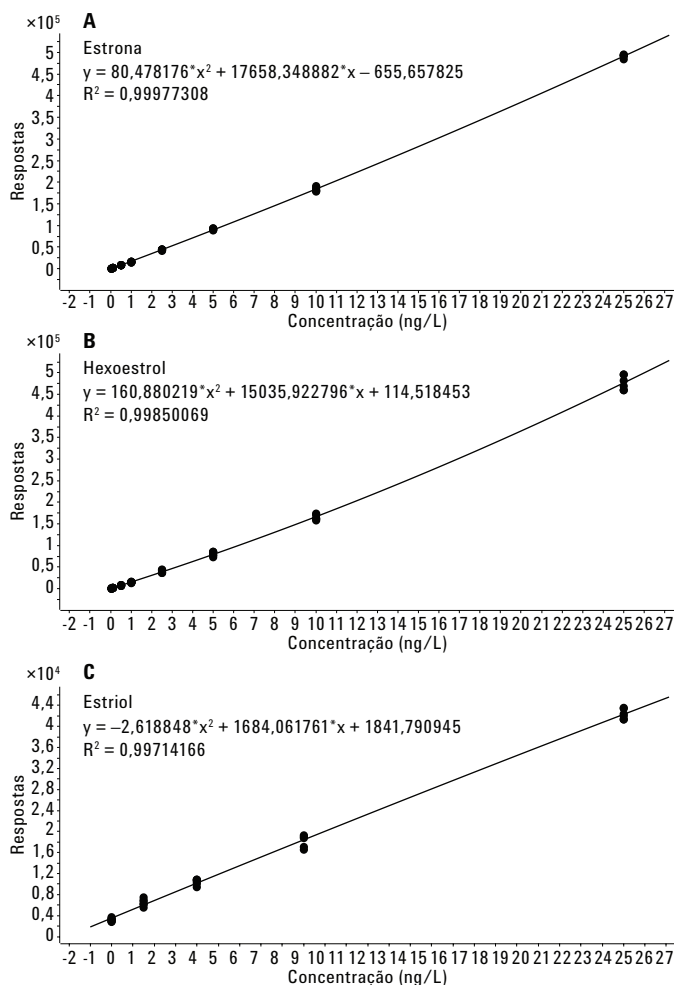


Figura 3. Curva de calibração (0,05-25 ng/L) para estrona (A), hexoestrol (B) e estriol (C) (1–25 ng/L) com $R^2 < 0,997$ medido com um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490 e um SPE on-line Agilent 1200 Infinity.

Tabela 6. R^2 para os métodos de injeção direta e SPE online em dois sistemas triplo quadrupolo diferentes.

	Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460		Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490	
	Injeção direta R^2 (2,5–200 ng/L)	SPE on-line R^2 (0,1–50 ng/L)	Injeção direta R^2 (0,5–50 ng/L)	SPE on-line R^2 (0,05–25 ng/L)
Estriol	0,999	0,999	0,998	0,996
17- α -Ethinilestradiol	0,999	0,998	0,997	0,998
17- β -Estradiol	0,999	0,999	0,998	0,999
Estrona	0,999	0,999	0,999	0,999
Hexoestrol	0,997	0,999	0,999	0,998

A Tabela 7 mostra uma comparação e um resumo dos métodos de injeção direta e SPE on-line em dois sistemas triplo quadrupolo. Para todos os métodos, o LOD, relação sinal-ruído (S/N) > 3 e o LOQ, S/N > 10 foram determinados.

A Tabela 7 demonstra um aumento significativo na sensibilidade entre o método de injeção direta e o método SPE on-line para ambos os detectores. Um aumento na sensibilidade também

pode ser observado entre os sistemas LC/MS triplo quadrupolo 6460 e 6490. Em geral, ganhos de sensibilidade entre 2 e 10 foram observados entre o método de injeção direta em relação ao método SPE on-line. O 17- α -etinilestradiol, em especial, aumentou com o processo de enriquecimento do SPE on-line. Para o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460, foi observado um fator de 50 para o LOD, de 5 ng/L com injeção direta e de 0,1 ng/L com SPE on-line (Figura 4).

Os limites de detecção mais baixos foram observados com o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6490 e com enriquecimento por SPE on-line. Estrona e hexoestrol podem ser medidos em concentrações de até 0,02 ng/L em água potável com adição. A Figura 5 mostra o LOQ para estrona.

Geralmente, a diferença de sensibilidade varia aproximadamente de 2 a 10 entre os sistemas LC/MS triplo quadrupolo 6460 e 6490.

Tabela 7. LOD e LOQ para os métodos de injeção direta e SPE on-line no sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e no sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490.

	Sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460				Sistema LC/MS triplo quadrupolo 6490			
	Injeção direta		SPE on-line		Injeção direta		SPE on-line	
	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
Estriol	10	25	5	10	5	10	1	2,5
17- α -Etinilestradiol	5	10	0,1	2	1	2,5	0,1	0,5
17- β -Estradiol	2	5	1	2,5	1	2,5	0,2	0,5
Estrona	1	2,5	0,2	1	0,1	0,5	0,02	0,05
Hexoestrol	1	2,5	0,2	0,5	0,1	0,5	0,02	0,05

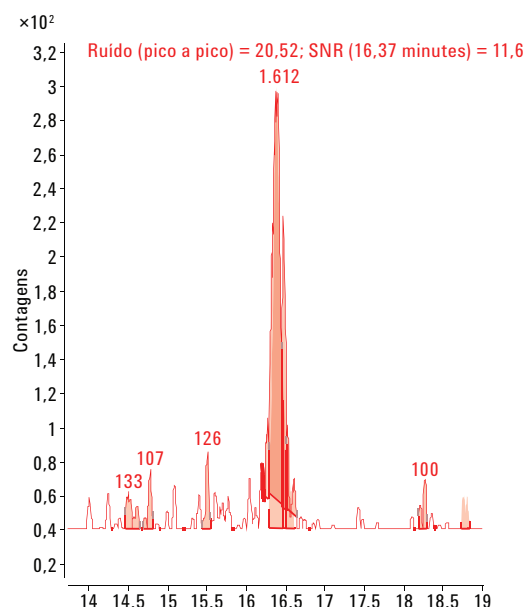


Figura 4. Medição do 17- α -etinilestradiol a uma concentração de 0,1 ng/L com injeção por SPE on-line em um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460.

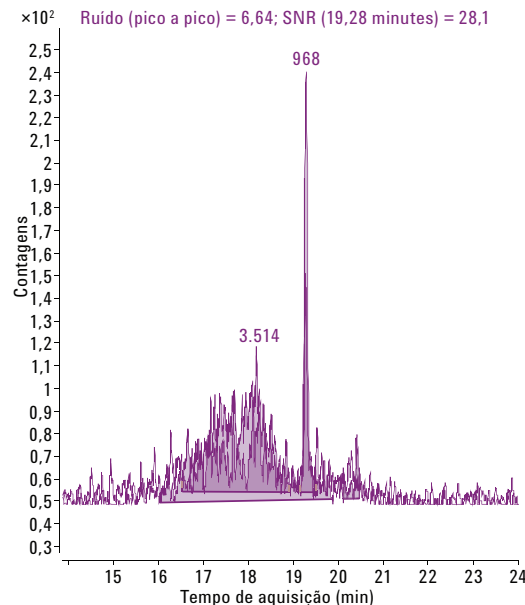


Figura 5. Medição de estrona a uma concentração de 0,05 ng/L em água potável com injeção por SPE on-line em um sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490.

Dados de precisão da área de LOD, LOQ e TR

Para o método SPE on-line, medições em replicata foram realizadas (n = 6) para a determinação do LOD, S/N > 3 e LOQ, S/N > 10 em relação aos dados de precisão da área nos sistemas LC/MS triplo quadrupolo 6460 e 6490.

A Tabela 8 mostra que o RSD da área para todos os compostos e para cada sistema LC/MS triplo quadrupolo foi geralmente <15% e o RSD médio da área foi de aproximadamente 10%.

O RSD da precisão do tempo de retenção (TR) para todas as corridas com SPE on-line e dois cartuchos usados alternativamente (n = 336) foi de 0,1%.

Carryover no SPE on-line

Para o SPE on-line série 1200 Infinity acoplado ao sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460, o carryover foi observado apenas para o 17- α -etinilestradiol na injeção em branco após o padrão mais alto, com 50 ng/L de estrogênios. A injeção em branco foi determinada como sendo 1% com uma razão S/N de 1,6.

Para o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6490 não foi observado carryover para nenhum composto.

Tabela 8. Dados de precisão da área para LOD e LOQ de todos os compostos com método SPE on-line nos sistemas LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 e Agilent 6490.

	Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460		Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6490	
	% RSD LOD	% RSD LOQ	% RSD LOD	% RSD LOQ
Estriol	8,31	8,35	13,07	10,29
17- α -Ethinilestradiol	2,31	11,72	19,30	18,27
17- β -Estradiol	5,11	7,91	11,51	11,68
Estrona	12,12	6,40	9,70	9,91
Hexoestrol	14,86	11,61	12,36	11,21

Conclusão

Para a análise sensível de estrogênios na água, a solução SPE on-line Agilent série 1200 Infinity oferece uma solução flexível e econômica. Injeções diretas, SPE on-line e injeções de alto volume (até 5 mL) com o SPE on-line podem ser feitas com um instrumento. Acoplado a diferentes detectores, como um sistema Agilent LC/MS triplo quadrupolo 6460 ou um sistema LC/MS triplo quadrupolo 6490, é possível obter sensibilidade aprimorada.

Para a análise de estrogênios na água potável, foi determinado um LOD até 0,02 ng/L. Excelente linearidade foi observada para todos os compostos em uma ampla faixa de concentrações com ambos os detectores de MS. Foi observado que o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6490 foi até 10 vezes mais sensível que o sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460.

Foi observado carryover apenas para o 17- α -etinilestradiol no sistema LC/MS triplo quadrupolo 6460. A injeção em branco foi determinada como sendo 1% com uma razão S/N de 1,6.

Os resultados deste trabalho mostram que a solução SPE on-line série 1200 Infinity é perfeitamente adequada para a análise de estrogênios em água. Devido à alta flexibilidade do sistema, é uma boa opção para laboratórios de médio rendimento que buscam resultados mais sensíveis para suas análises de água e precisam de uma solução flexível para diferentes aplicações.

Referências

1. M.J. López de Alda e D. Barceló "Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progesterones in sediment and water" *Journal of Chromatography A*, 938 145-153 (2001).
2. J.M. Ronan e B. McHugh "A sensitive liquid chromatography/ tandem mass spectrometry method for the determination of natural and synthetic steroid estrogens in seawater and marine biota, with a focus on proposed Water Framework Directive Environmental Quality Standards" *Rapid Commun. Mass Spectrom* 27, 738-746 (2013).
3. Diretiva n.º 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de outubro de 2000, que estabelece uma estrutura de ação comunitária no domínio da política da água, *Official Journal of the European Communities* (2000).
4. B. Schuhn "High volume injection up to 5 mL with the Agilent 1200 Infinity Series Online SPE Solution for highest sensitivity" Descrição técnica, Número de publicação 5991-3173EN (2013).
5. Edgar Naegele "Comparison of Direct Injection and Online SPE for Quantification by LC/MS of Trace-Level Herbicides in Water" Nota de aplicação Agilent Technologies, Número de publicação 5991-2140EN (2013).
6. R. Hindle "Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS" Nota de aplicação Agilent Technologies, Número de publicação 5991-2473EN (2013).

www.agilent.com/chem

Estas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2014
Publicado nos EUA, 1º de março de 2014
5991-3440PTBR



Agilent Technologies