[APPLICATION NOTE]

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

# 通过整合技术和简化工作流程对内分泌干扰物分析

Paul Silcock[1], Alan Wainwright[2], and Chris Hunter[2]
[1] Waters Corporation, Manchester, UK
[2] Environment Agency - National Laboratory Service, Leeds, UK

## 简介

为了现在及将来而保护环境是全球组织机构应该履行的重要职责。通过减少直接或间接地污染物排放、维护生态系统及提供更安全的食物和水而获得更高的生活质量。对于使用水生产产品或提供水的公司，有效的处理过程和最终产品的质量也是很重要的。对于监控者，保护环境和消费者的一个关键部分是监测和发现你所关心的物质。由于较新出现的污染物的高度传播，这变得越来越重要。

内分泌干扰物(EDCs)在环境和饮用水中的存在已经引起组织机构越来越大的关注。这些化合物通常在很低的浓度就对人类和野生动物产生生理影响[1]。某种类型的EDCs是具有动物激素活性的物质。这些当然包括天然的和合成的雌激素，以及类似雌激素受体的烷基酚化合物。这需要监测浓度低至ppt的环境表面水和污水等复杂的样品中的这些化合物。

为了达到这个目的，成熟的样品前处理化学品和强大的分析系统需要有效的结合。比较不同的分析雌激素化合物的方法，LC/MS/MS方法具有较广的适用性[3]。通常LC/MS/MS这种方式在对已知物进行分析中可提供相当的选择性和灵敏度，同时这种类型的仪器在分析未知化合物时也具有相当的优势，它在采集数据的同时提供了未知化合物的许多其它信息以利于样品分析的质量控制和发现非目标组分。

除了机构现在的职责工作外，使用LC/MS/MS开发一套可靠的、高灵敏度的、多组分的方法通常需要大量的时间和资源投资。这意味着得到定性结果的速度是个关键的因素。所以，快速建立和运行新性能方法的能力是有必要的。

这篇文献描述了融合了Xevo™ TQ MS的Waters® Oasis® HLB 样品前处理方法对地下水、河水和排放污水中低至ppt浓度的内分泌干扰物进行分析的方法。文献也描述了使用智能化工作流程工具进行方法开发，以及先进的双Scan-MRM模式的LC/MS/MS分析。

照片：Dave Gostisha/Ziptrivia llc

## 实验

### 样品制备

使用5-cc/200-mg Waters Oasis HLB SPE小柱对地下水、河水和污水的加标提取物进行处理。处理方法基于Waters环境色谱方法指导(No.720002543en)的方法，最终提取溶剂与流动相相匹配。

## UPLC 条件

| | |
|---|---|
| LC系统: | ACQUITY UPLC® |
| 运行时间: | 5.30min |
| 色谱柱: | ACQUITY® BEH $C_{18}$ 1.7μm, 2.1×50mm |
| 柱温: | 40°C |
| 流动相: | |
| A: | 0.05%氨水 |
| B: | 甲醇 |
| 流速: | 0.6mL/min |
| 进样体积: | 10μL |

## MS条件

| | |
|---|---|
| MS系统: | Xevo TQ |
| 采集模式: | 双Scan-MRM模式 |
| 电离模式: | ESI- |
| 毛细管电压: | 2.0kV |
| 源温度: | 150°C |
| 脱溶剂气温度: | 650°C |
| 脱溶剂气: | 1100L/hr |
| 锥孔气流速: | 20mL/min |
| 碰撞气流速: | 0.18mL/min |

| 时间(min) | 流速 | %A | %B |
|---|---|---|---|
| 1. 起始 | 0.60 | 65.0 | 35.0 |
| 2. 3.00 | 0.60 | 5.0 | 95.0 |
| 3. 4.20 | 0.60 | 5.0 | 95.0 |
| 4. 4.30 | 0.60 | 65.0 | 35.0 |

Xevo TQ MS设置(质量分辨率、质量校正、离子源优化)是通过IntelliStart™软件自动进行的。分析内分泌干扰物的MRM方法是使用IntelliStart进行全自动方法开发得到的。IntelliStart仅需要输入化合物基本信息，即可自动找出母离子，优化锥孔电压，找到子离子，以及优化碰撞能量。图1是用IntelliStart进行方法开发后得到的报告图。

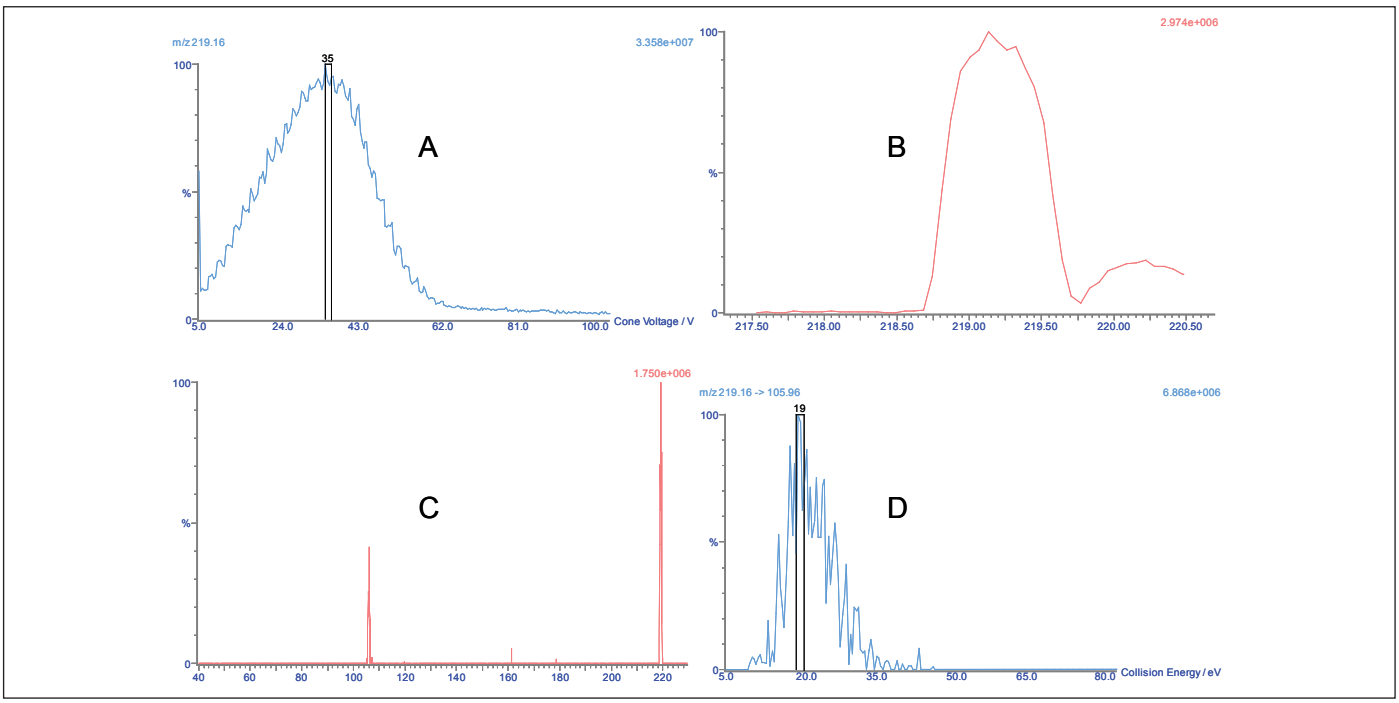


*图1IntelliStart对4-壬基苯酚方法开发报告结果图优化锥孔电压(A)、优化的质谱图(B)、子离子图(C)、优化碰撞能量(D)。*

图2显示了Xevo TQ MS方法开发工作流程。IntelliStart产生多个MRM通道，基质中的这些通道的选择都是基于选择性和灵敏度而使用的。表1提供了在Xevo TQ MS上使用IntelliStart得到的内分泌干扰物的MRM条件。用IntelliStart方法开发后，化合物信息和主要的参数都会被输出到Quanpedia™化合物数据库中。

除了MRM数据，全扫描数据也可以使用Xevo TQ MS的双Scan-MRM模式采集得到。这个功能使得在通常的定量分析过程中允许实时采集得到样品基质的定性信息。

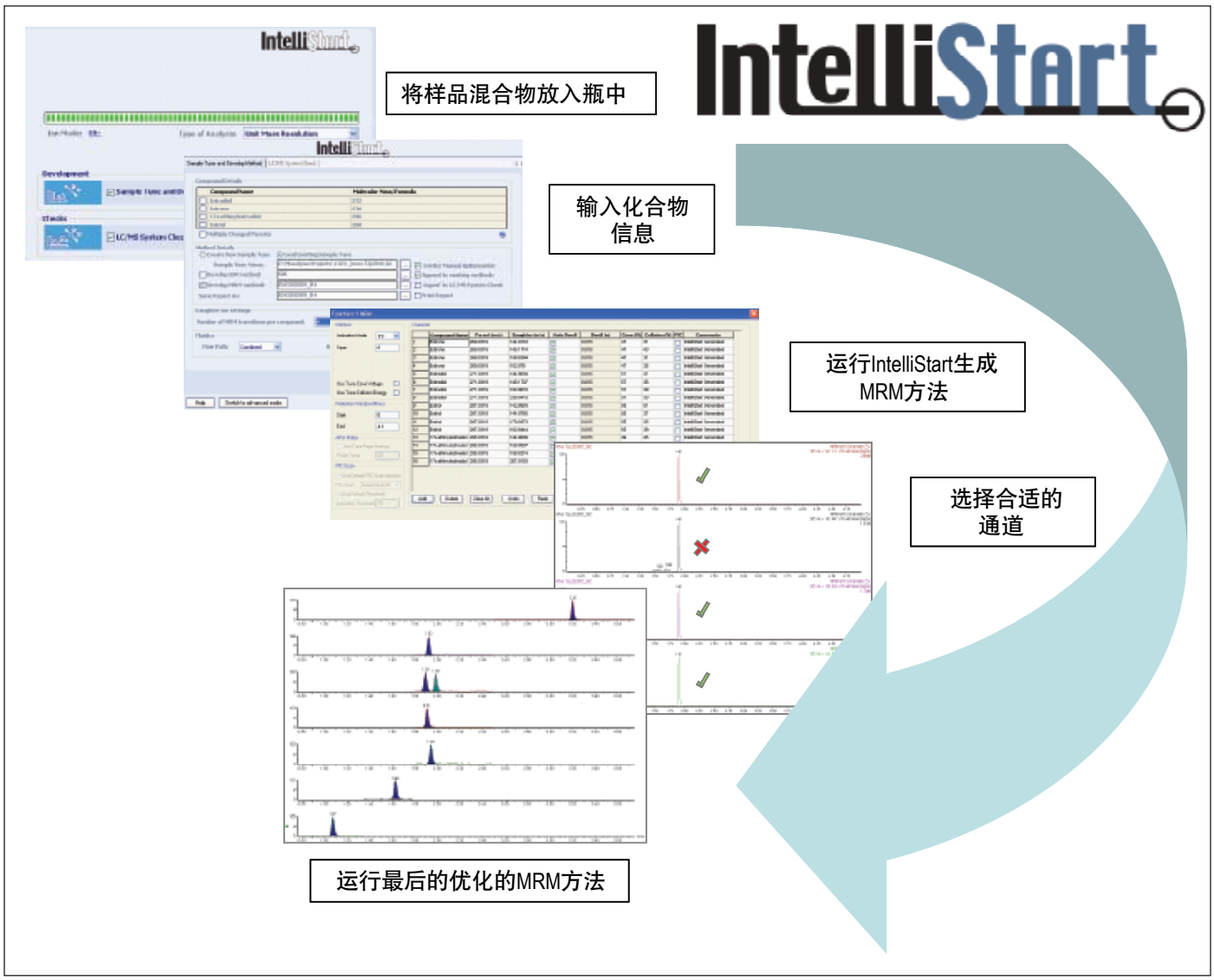


*图2 Xevo TQ MS的IntelliStart方法开发工作流程。*

| 化合物 | 分子量 | 母离子 | 子离子 | 锥孔电压(V) | 碰撞能量(eV) |
|---|---|---|---|---|---|
| 雌激素三醇 | 288 | 287.2 | 145.0 | 53 | 39 |
| 雌激素三醇 | 288 | 287.2 | 171.0 | 53 | 37 |
| 双酚A | 228 | 227.1 | 133.0 | 31 | 25 |
| 双酚A | 228 | 227.1 | 212.0 | 31 | 17 |
| 己烯雌酚 | 268 | 267.1 | 237.1 | 35 | 29 |
| 己烯雌酚 | 268 | 267.1 | 251.1 | 35 | 25 |
| 雌激素酮 | 270 | 269.2 | 145.1 | 47 | 36 |
| 雌激素酮 | 270 | 269.2 | 143.0 | 47 | 48 |
| 雌二醇 | 272 | 271.2 | 183.1 | 51 | 31 |
| 雌二醇 | 272 | 271.2 | 145.1 | 51 | 40 |
| 雌二醇 D4 | 276 | 275.2 | 147.1 | 55 | 37 |
| 17α乙炔雌二醇 | 296 | 295.2 | 145.1 | 45 | 37 |
| 17α乙炔雌二醇 | 296 | 295.2 | 158.9 | 45 | 33 |
| 4-壬基苯酚 | 220 | 219.2 | 106.0 | 35 | 19 |

*表1. IntelliStart EDC MRM条件的选择。*

## 数据采集和处理

使用MassLynx™ V.4.1进行数据采集和谱图处理。使用TargetLynx™ 处理MRM数据及使用TrendPlot进行选择参数的多序列对比。

## 结果和讨论

使用了Oasis HLB 固相萃取小柱对地下水、河水和污水的加标样品进行浓缩处理，结果显示仪器有很高的选择性和灵敏度，可以检测到ng/ml浓度水平。当在3.2min洗脱出最后的组分时，ACQUITY UPLC 对同分异构体17α和17β雌二醇保持了很好的分离度。这使得分析系统具有很高的样品通量。图3显示了地下水、河水和污水加标1ng/mL的色谱图(相当于经Oasis HLB富集后的5ng/mL)。

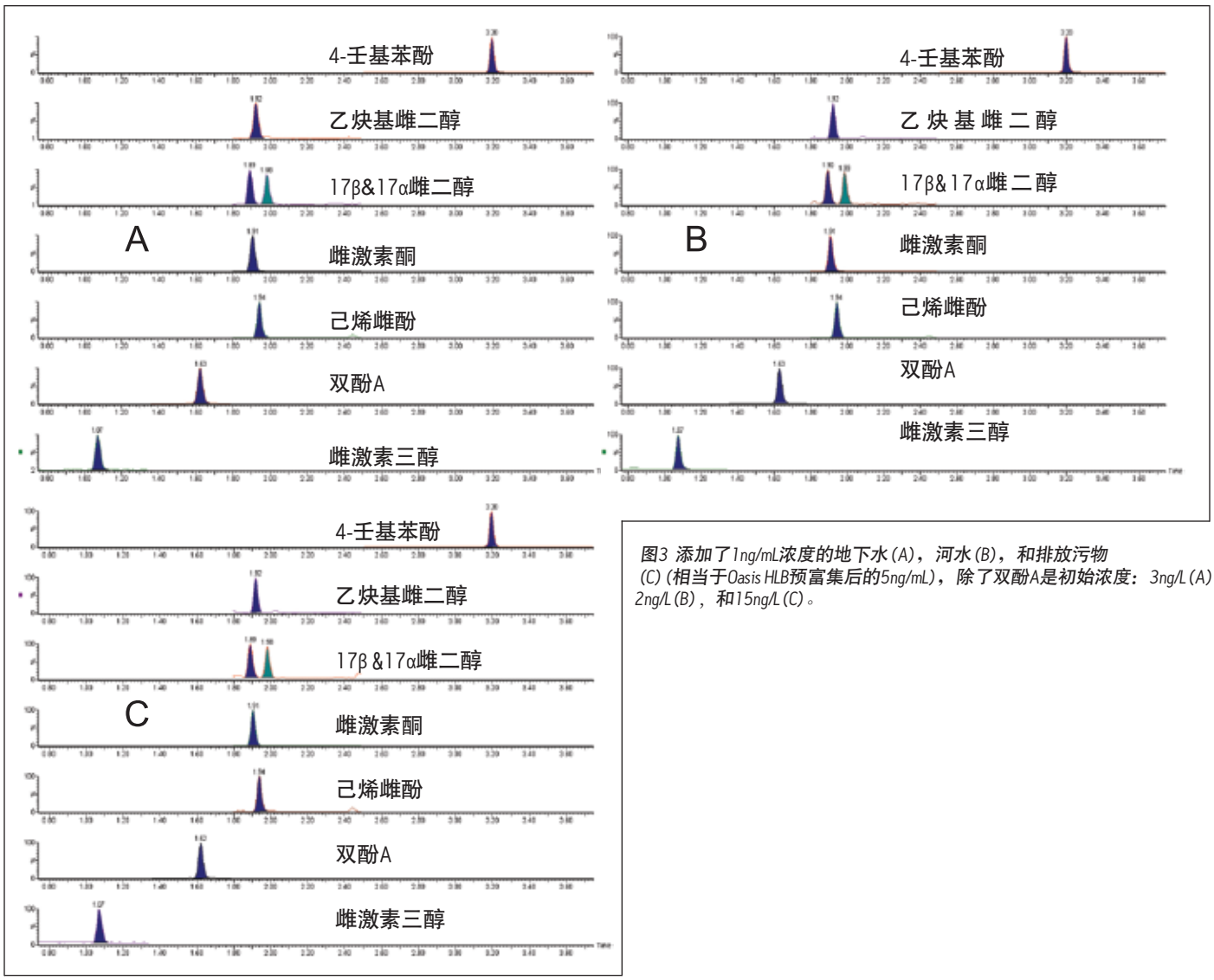


*图3 添加了1ng/mL浓度的地下水(A)，河水(B)，和排放污物(C)(相当于Oasis HLB预富集后的5ng/mL)，除了双酚A是初始浓度：3ng/L(A)，2ng/L(B)，和15ng/L(C)。*

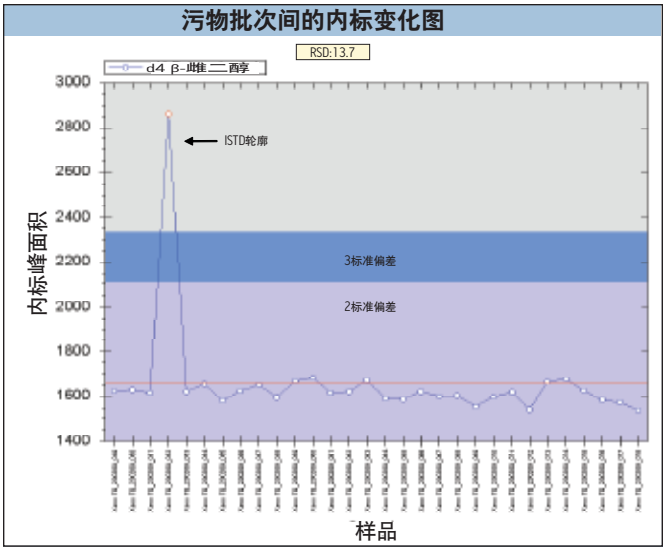


*图4. D4-β-雌二醇峰面积对应批次样品的绘制图。*

在数据处理中，TargetLynx中的TrendPlot功能被用来监测批次间的参数以监控异常。图4显示了内标D4-β-雌二醇对应批次样品的绘制图。这可以很容易监控到可能的加标错误。

## 双Scan-MRM基质监测

全扫描质谱图可以和定量的MRMs同时采集以监测样品中的背景基质。这使得可以采集到常规的定量分析中经常丢失的数据，并可以帮助改善方法提高峰面积，同时提供非目标化合物信息。

## 方法开发和QC的基质监测

图5显示了使用双Scan-MRM模式对污水加标的基质监测图。使用这种采集模式，有可能发现来源于样品和/或实验室处理过程带来的背景基质组分。腐殖质和富啡酸物质有可能引起意想不到的基质效应，可以看到这些物质会在第一个分析峰(雌激素三醇)之前被洗脱出来，从而更加确信目标组分的定量能力。另外，被怀疑的、高浓度的、产生297、311、325和339m/z离子的阴离子表面活性剂LAS(直链烷基苯磺酸钠)也能在色谱图中找到。这可以通过使用ScanWave™子离子扫描功能进一步验证，因为每个离子都有很强的183m/z特征子离子。

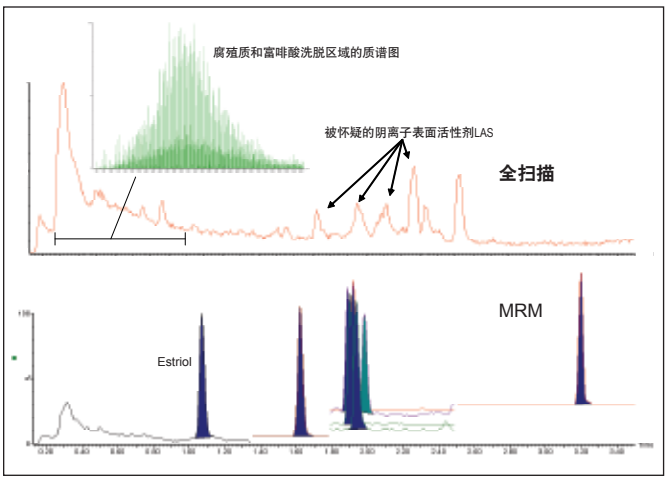


*图5. 使用双Scan-MRM模式的、污水加标的基质监测图。*

基质监测也可以得到和基质组分共流出的目标离子。图6显示了同样的污水加标样品和包括LAS在内的基质组分共流出物的扩大区域。MRM采集模式的专属性允许在基质峰存在的情况下对目标分析物进行定量，但是可以观察到每个样品的潜在基质效应的能力可以实现额外的QC监控和方法学的连续提升。

## 非MRM目标化合物的基质监测

在常规的定量分析中使用双Scan-MRM模式也可以根据潜在污染物的新信息，从样品中追溯出非目标化合物的数据。

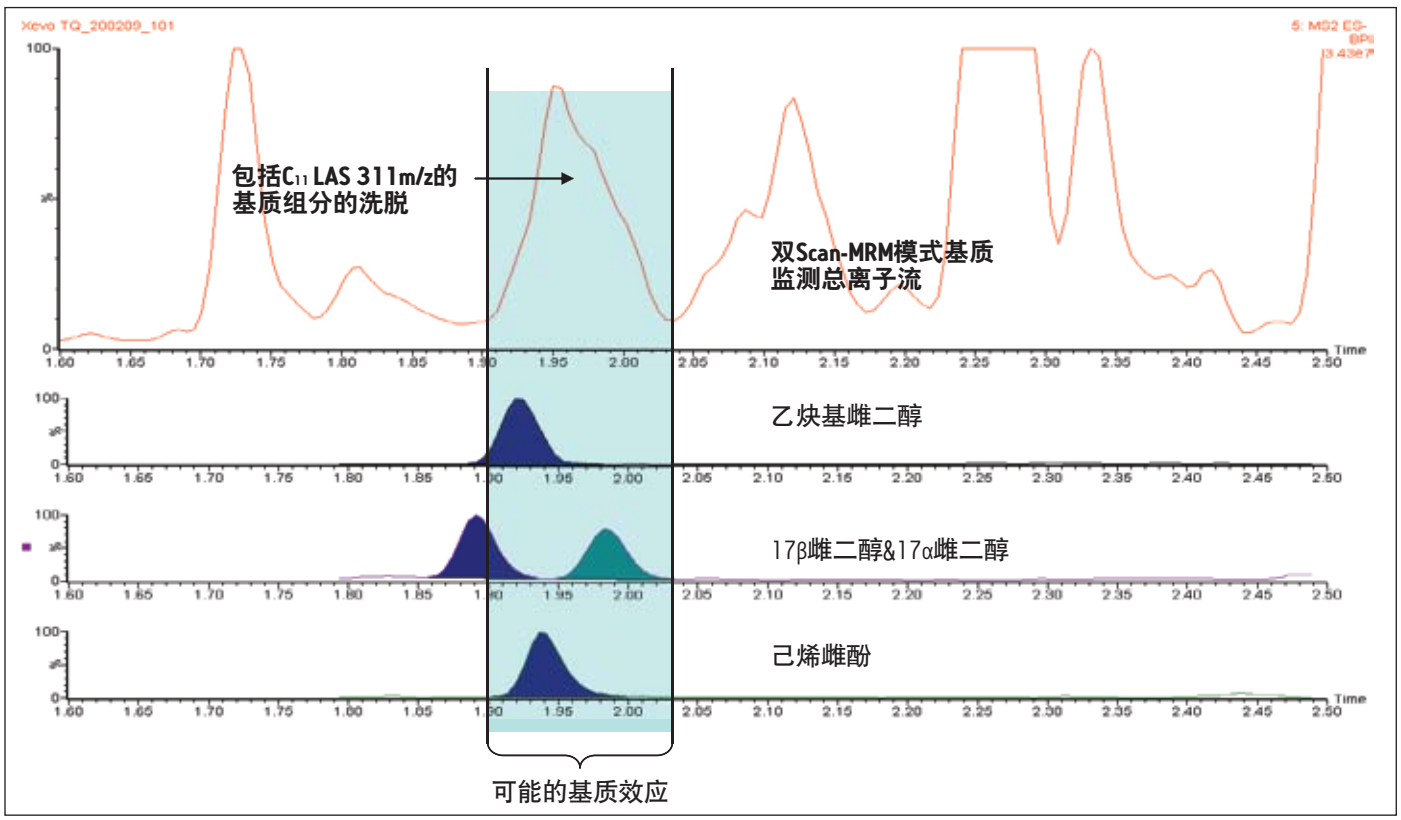


*图6. 使用双Scan-MRM观察到的同样的污水加标样品和包括LAS在内的一些基质组分共流出物的扩大区域。*

双Scan-MRM可被用来观察样品中没有在MRM中设定为目标的化合物。为了证明这点，另外的等同于20ng/L的五氯苯酚加标的污水样品，用双Scan-MRM模式与EDCS中的目标MRMs一起分析。图7显示了添加五氯苯酚的污水样品的叠加的总离子流和264.8m/z的提取图，以及从总离子流图中观察到的峰的提取质谱图。

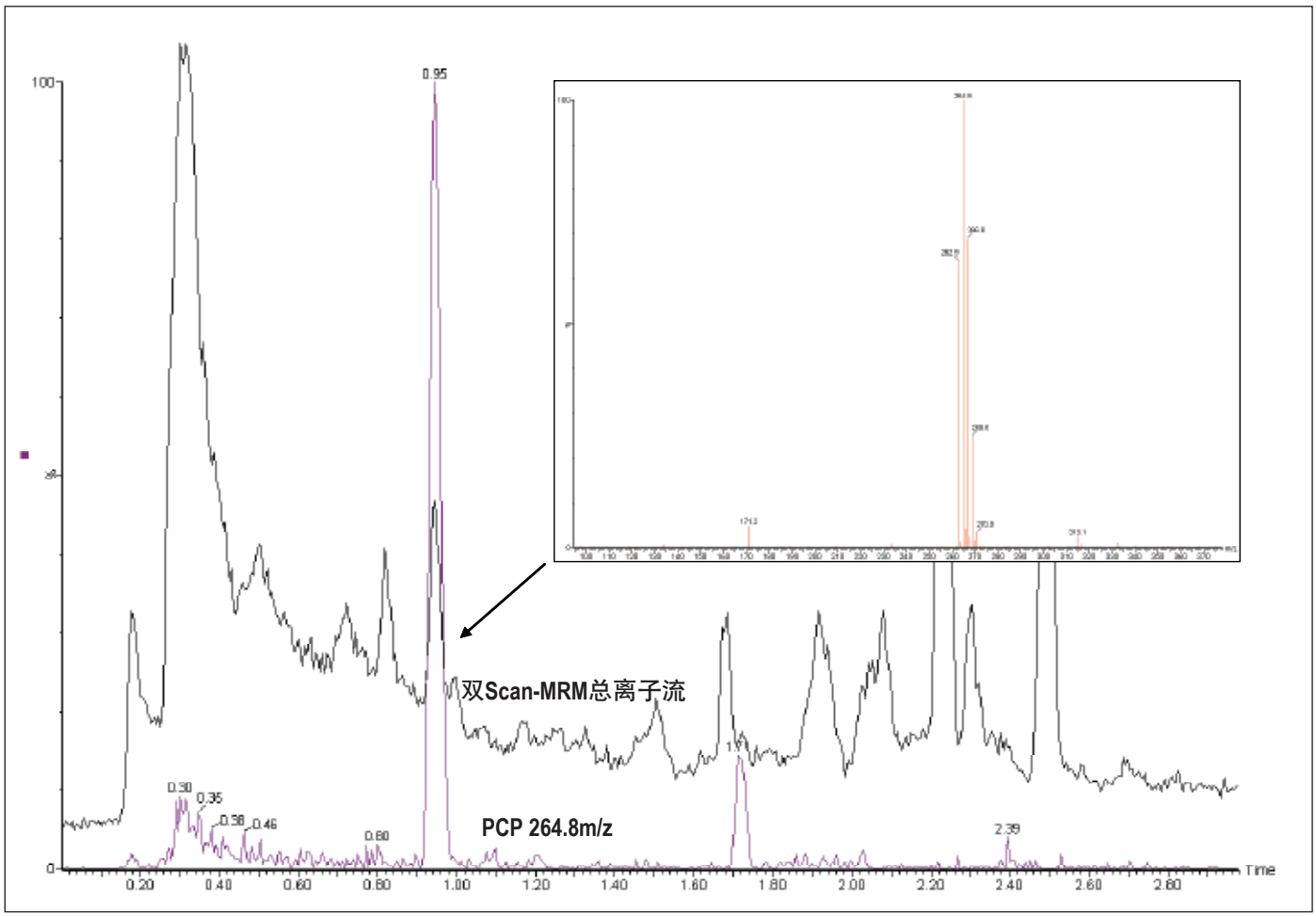


*图7. 添加五氯苯酚的污水样品的叠加的总离子流和264.8m/z的提取图，以及总离子流图中观察到的峰的提取质谱图。*

## 结论

IntelliStart Technology on Xevo TQ MS can streamline the workflow

Xevo TQ MS 的IntelliStart技术可以使得开发内分泌干扰物高灵敏的MRM采集方法过程变成流线型工作流程。这意味着需要更少的时间来开发方法，而且得到实际样品结果速度更快。

对地下水、河水和污水中的低浓度水平的EDCs进行检测时，Xevo TQ MS有高的灵敏度和选择性。

ACQUITY UPLC在保持同分异构体17α和17β雌二醇的分离度的同时，可以有高的样品通量。

TrendPlot工具可以快速发现批次间数据的差异，并帮助确保所产生结果的质量。

双Scan-MRM模式可以在采集MRM数据的同时得到全扫描数据。这可以依次监测方法开发、QC控制，以及发现非目标组分。

## References


1 Colborn T, Soto A, vom Saal F. 1993 Environmental Health Perspectives. 101(5):378–384.

2 A Pillon et al., Environ Health Perspect. 2005 113(3): 278–284.

3 M Silvia Díaz-Cruz et al. Journal of Mass Spectrometry. 2003 38(9): 917 – 923.


Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™


Waters, Oasis, ACQUITY UPLC, 和 ACQUITY 是沃特世公司的注册商标。 Xevo, IntelliStart, ScanWave,MassLynx, TargetLynx, Quanpedia, 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司的商标。所有其他的商标属于各自的所有者。

©2009 沃特世公司 中国印刷



2009年9月 720003013ZH AG-PDF



沃特斯中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010-5293 6688
上海：021-6879 5888
广州：020-8626 6678
香港：852-2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com