

# Определение шести эстрогенов и фенольных гормонов (фитогормонов) в воде

## 1. Инструменты и расходные материалы

- Система ТФЭ Fotector Plus
- Система ТФЭ ASPE Ultra 06
- Система упаривания в токе азота AutoEVA-60
- Система ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором
- Картридж ТФЭ HLB (RayCure HLB, 60 мг/3 мл, арт. № RC- 204-36473)
- Метанол, ацетонитрил, этилацетат (хроматографическая степень TEDIA), аммиак, муравьиная кислота, тиосульфат натрия (ч.д.а.)
- 6 смешанных стандартов эстрогена и фенольных гормонов окружающей среды: внутренний стандарт бисфенол А-D16, внутренний стандарт нонилфенол-D8.

## 2. Предварительная обработка образцов

Перед отбором проб необходимо добавить тиосульфат натрия (80 мг/л), чтобы устранить влияние остаточного хлора в воде. Добавьте муравьиную кислоту, чтобы довести конечный pH до 2–3, а затем добавьте соответствующее количество внутреннего стандарта, чтобы конечный экстракт содержал внутренний стандарт.



Рис.1.Высокопроизводительная автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus

Концентрация вещества (рассчитанная на основе 100% степени извлечения) соответствует концентрации внутреннего стандарта, добавленного в серию стандартов.

Кондиционируйте картридж ТФЭ элюирующим раствором, метанолом и сверхчистой водой соответственно, а затем пропустите предварительно очищенную пробу воды через картридж. После завершения экстрагирования высушите картридж азотом, элюируйте 10%-ным водным раствором метанола, а затем элюируйте 5,0 мл раствора этилацетат:метанол = 9:1. Продуйте картридж ТФЭ азотом почти досуха и доведите объем до 1,00 мл с помощью 1+1 метанола и воды (объемное соотношение, содержащее 10% аммиачной воды) для анализа жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии.

## 2.1 Условия твердофазной экстракции

Автоматизированная система	Высокопроизводительная автоматизированная система ТФЭ Fotector Plus/ Автоматизированная система ТФЭ ASPE Ultra 06
ТФЭ картридж	HLB (RayCure, 60 мг/3 mL)
активация	10% Метанол/этилацетат, метанол, вода
Промывка	10% метанол/вода
Элюирование	10% Метанол/этилацетат

Рис.2 Программа экстракции Fotector Plus

номер	Этап	Растворитель	Слив	Скорость потока (мл/мин)	Объем (мл)	Время (мин)
1	Кондиционирование	10%meth-Et...	Waste2	3	5	2.1
2	Кондиционирование	СН3ОН	Waste2	2	5	2.9
3	Кондиционирование	H2O	Waste1	3	5	2.1
4	Загрузка образца большого объема	SAM13-18	Waste1	8	1100	174.5
5	Промывка	H2O	Waste1	10	10	1.6
6	Прогревка		Waste1	60	20	1.6
7	Сушка					5
8	Промывка шприца	СН3ОН		30	2	0.4
9	Промывка шприца	10%meth-Et...		30	3	0.5
10	Элюирование	10%meth-Et...	Сбор	1	7	7.5
11	Прогревка		Waste2	10	5	1.1
12	Конец программы					
13						

## 2.2 Условия проведения анализа образцов

Колонка	Waters XBridge BEH HILIC 1.7µm×21×50mm
скорость потока	0.200 мл/мин
Мобильная фаза	A: вода B: ацетонитрил
Температура	40°C
Объем впрыска	10мкл
Детектор	масс-спектрометрический
Ионный режим продувка газом	ESI-
Температура азота	300°C

Время (мин)	%A	%B
0.00	95	5
1.00	95	5
6.00	10	90
11.00	10	90
11.01	95	5
16.00	95	5

Таблица 1. Градиент элюирования

Температура источника ионов	300°C
напряжение (ESI)	4000
CID Давление	35psi

## 2.3 Параметры MRM

Компонент	Родительский ион (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Время удерживания (мин)	Напряжение (v)	Энергия соударения (ev)	уравнение регрессии	Коэффициент корреляции (R <sup>2</sup> )	Линейный диапазон мкг/л
Этинилэстрадиол	295.2	159.0	7.647	170	40	Y=0.2837078*x-1.832454E-004	R=0.9976	2~50
	295.2*	145.1*		170	44			
эстрон	269.2	159.2	6.643	170	32	Y=2.366781*x+0.041850	R=0.9996	2~50
	269.2*	145.1*		170	42			
эстрадиол	271.2	182.9	7.920	180	40	Y=0.433003*x+0.0019996	R=0.9966	2~50
	271.2*	145.0*		180	40			
эстриол	287.2	171.0	9.729	180	40	Y=0.465063*x-0.001618	R=0.9977	2~50
	287.2*	145.0*		180	48			
октил	205.1	119.0	10.112	140	32	Y=1.841091*x-0.033162	R=0.9989	2~50
	205.1*	105.9*		140	18			
нонилфенол	219.0	119.0	7.835	140	34	Y=1.338263*x-0.023662	R=0.9962	2~50
	219.0*	105.9*		140	20			
бисфенол A-D16	241.2*	223.3*	10.183	130	18			
	241.2	142.1		130	26			
NP D8	227.2*	112.0*	7.572	132	21			
	227.2	125.8		132	30			

\*Репрезентативный ион

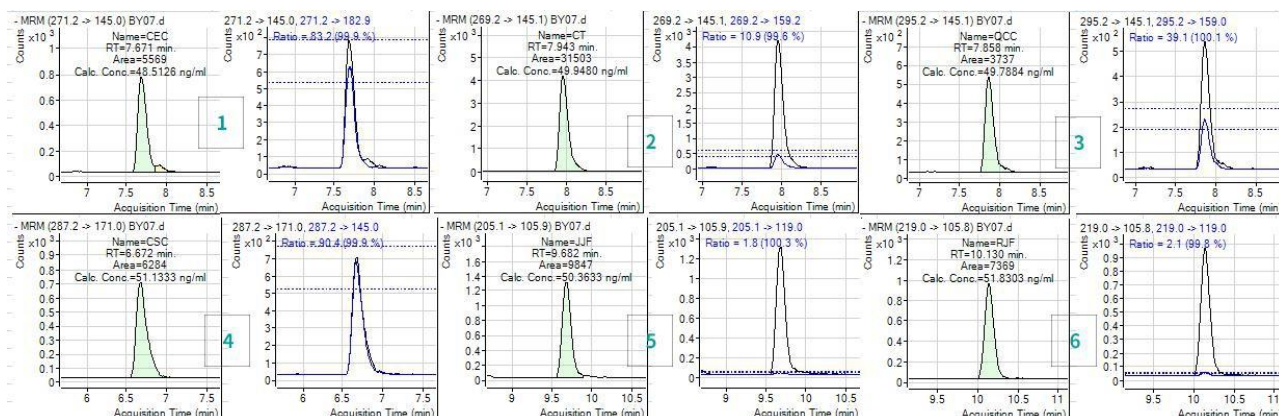


Рисунок 9. Компоненты MRM-1 Эстрадиол 2 Эстрон 3 Этинилэстрадиол 4 Эстриол 5 Октилфенол 6 Нонилфенол

## 3. Результаты и их обсуждение

При проведении пробоподготовки добавлено необходимое количество стандартного раствора в воду, для проведения ТФЭ использовалась высокопроизводительная автоматизированная система ТФЭ Fotector Plus, для проведения анализа использовалась ВЭЖХ-МС/МС. Для количественного определения используется метод добавления стандарта с концентрацией 5 нг/л.

После количественного определения методом внутреннего стандарта обнаруженное содержание составляло от 18,6

до 22,5 нг/л, а RSD составляло от 3,2 до 9,8. После количественного определения методом внутреннего стандарта был добавлен стандарт 40 нг/л, а результат получили в диапазоне между 37,6 и 43,2 нг/л.л, RSD находится в пределах 2,4~7,5, степень извлечения и RSD семи параллельных образцов следующие: Показано в таблице 2.

Таблица.2. Степень извлечения и воспроизводимость анализа 6 гормонов окружающей среды (n=7)

Компонент	5нг/л стандарт		20нг/л стандарт		40нг/л стандарт	
	Avg.	RSD	Avg.	RSD	Avg.	RSD
этинилэстрадиол	4.54	9.1	19.7	8.1	38.3	7.2
эстрон	4.75	6.9	21.0	9.6	41.1	2.4
Эстрадиол	4.42	9.6	22.0	3.2	37.6	4.6
Эстриол	5.63	8.5	19.2	9.8	37.6	7.5
Октилфенол	4.69	5.4	22.5	9.2	43.2	7.2
нонилфенол	5.36	5.3	18.6	2.7	38.1	7.5

#### 4. Преимущества решения

Высокопроизводительная, полностью автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus может обрабатывать 6 образцов одновременно, а непрерывно в автоматическом режиме - 60 за рабочую смену. В системе полностью автоматизированы основные этапы: кондиционирование, загрузка, промывка, элюирование и т. д., что значительно повышает эффективность, точность и надежность, обеспечивают высокую степень извлечения.

Автоматизированная система ТФЭ ASPE Ultra 06 предназначена специально для пробоподготовки проб воды, объединяет кондиционирование, экстрагирование, элюирование и концентрирование за один этап, что делает данную систему удобной и универсальной.

Автоматизированная система упаривания в токе азота AutoEVA-60 производит быстрое одновременное упаривание партий образцов.



**Автоматизированная система  
ТФЭ серии Fotector  
Очистка**



**Автоматизированная система ТФЭ  
серии ASPE  
Очистка**



**Автоматизированная система  
упаривания в токе азота  
серии EVA  
Концентрирование**