

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定水中 7 种环境雌激素

LCMSMS-295

摘要： 本文建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用技术测定水中 7 种环境雌激素方法。通过使用杂质延迟法，消除双酚 A 和壬基酚的系统残留对检测的影响，从而提高环境雌激素中双酚 A 和壬基酚的检测灵敏度。其中 7 种环境雌激素的线性良好，相关系数均大于 0.999，定量限为 0.16 $\mu\text{g/L}$ ~0.48 $\mu\text{g/L}$ 之间。仪器重复性良好，不同浓度标准溶液连续进样 6 次，保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.15% 和 4.90% 以下，空白基质加标回收率在 83.5%~109% 之间。

关键词： 水 环境雌激素 EDCs 三重四极杆质谱

内分泌干扰化合物 (Endocrine Chemicals, 简称 EDCs) 是指能干扰体内天然激素合成、分泌、运输、结合、作用、代谢和消除的外源性化学物质，它们表现出拟天然激素或抗天然激素的作用，此又称环境雌激素。环境雌激素以微量或痕量浓度作用于生物时，通过模拟或阻断天然激素，干扰损害生物体内正常的内分泌过程，破坏机体稳定性和调节功能，对机体的生殖、神经和免疫系统造成危害。

环境雌激素广泛存在于自然界，近年来已成为水安全问题的重要关注点。自 1995 年，美国华盛顿召开工业各行业协会的《关于扰乱内分泌的化学物质各协会联席会议》，并于次年修改了饮用水安全法。后来有大量

文献报道在水厂的进出水口、地表水、沉积物和地下水等环境介质甚至饮用水中也发现了环境雌激素。

然而，目前在国内仍没有环境雌激素的国家测试标准。2017 年 3 月 6 日，广东省质量技术监督局发布了测试环境雌激素即《水中 6 种环境雌激素类化合物的测定 - 固相萃取 - 高效液相色谱 - 串联质谱法》的地方标准报批公示稿。本文参考该标准方法，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统，建立快速、准确测定水体中环境雌激素的方法。该方法的灵敏度高，仪器定量限为 0.16 $\mu\text{g/L}$ ~0.48 $\mu\text{g/L}$ 之间，明显高于该地方标准限值要求 (仪器定量限 2.0 $\mu\text{g/L}$)，可供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统，包括 LC-30AD \times 2(输液泵)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-30A(柱温箱)，CBM-20A(系统控制器)，DGU-20A₅(在线脱气机)，LCMS-8050(三重四极杆液质)和 LabSolutionsVer 5.86。

1.2 分析条件

液相条件

延迟柱：Shimadzu (GL) AQ-C18 HP 2.1 mm I.D.
 \times 50 mm L.,3.0 μm

色谱柱：Shimadzu (GL) AQ-C18 HP 2.1 mm I.D.
 \times 100 mm L.,3.0 μm

流动相：A 相 -0.033% 氨水溶液；B 相 - 甲醇

流速：0.40 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始为 25%。

具体见下程序表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	25
3.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.30	Pumps	Pump B Conc.	90
5.40	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.10	Pumps	Pump B Conc.	25
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI (-)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

接口温度: 350°C

加热模块温度: 450°C

驻留时间: 8.0 msec

离子喷雾电压: 默认调谐电压

加热气: 空气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 280°C

延迟时间: 3.0 msec

MRM 参数: 见表 2

表2 EDCs质谱参数

No.	化合物	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	雌三醇	Estriol	50-27-1	287.10	145.05*	15	41	13
					215.10	15	36	10
2	双酚 A	Bisphenol A	80-05-7	227.05	212.05*	12	19	23
					133.10	12	24	13
3	炔雌醇	Ethinylestradiol	57-63-6	295.15	145.05*	12	45	25
					143.00	12	54	13
4	雌酮	Estrone	53-16-7	269.10	145.00*	10	38	14
					143.05	14	53	13
5	雌二醇	Estradiol	50-28-2	271.10	145.10*	16	41	14
					183.10	14	40	11
6	辛基酚	4-n-Octylphenol	27193-28-8	205.10	133.15*	10	25	12
					147.10	10	25	12
7	壬基酚 [#]	Nonylphenol	84852-15-3	219.10	133.00*	11	31	12
					147.10	11	31	12

*表示定量离子对; #表示壬基酚为技术级标准品, 为同分异构体混合物。



图1 延迟法液相系统连接示意图

1.3 标准配制及样品前处理

标准溶液配制：甲醇配制 1.0 mg/mL 各单标储备溶液，使用 25% 甲醇水溶液配制 EDCs 混合标准溶液，浓度分别为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ 。

样品前处理步骤：取 1 L 水样，玻璃纤维膜过滤，调节 pH 为 2，过 HLB 固相萃取柱 (1 g, 6 mL)。HLB 柱分别用 10 mL 乙酸乙酯 / 甲醇混合溶液 (9/1)、10 mL 甲醇和 10 mL 水活化。上样后分别用 10 mL 甲醇 / 水溶液淋洗 (1/9)、10 mL 乙酸乙酯 / 甲醇混合溶液 (9/1) 洗脱，洗脱液氮气吹干，用初始比例流动相定容至 1 mL。

结果与讨论

2.1 系统残留确认

按照 1.2 条件，不接延迟柱采集系统本底数据，发现系统中有双酚 A (以下简称 BPA) 和壬基酚 (以下简称 NP) 残留。结果见图 2 和图 4。同时，查阅相关文献发现系统残留与液相测试条件也有一定关系。为此，在 LC 等度条件 (A/B=25/75) 不接延迟柱下测试，结果未发现有 BPA 和 NP 残留 (结果见图 3 和图 5)。由此说明，BPA 和 NP 的系统残留在梯度条件下具有一定的累积效应。

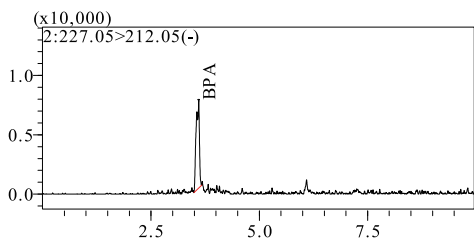


图2 梯度条件不接延迟柱时BPA的系统残留

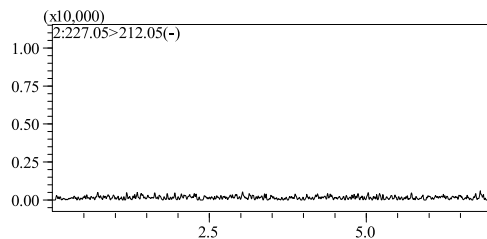


图3 等度条件不接延迟柱BPA无系统残留

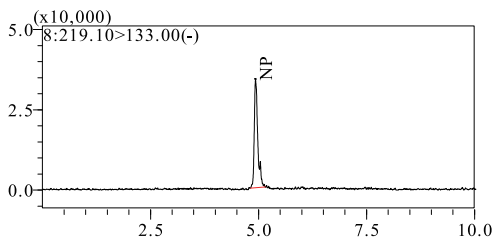


图4 梯度条件不接延迟柱NP的系统残留

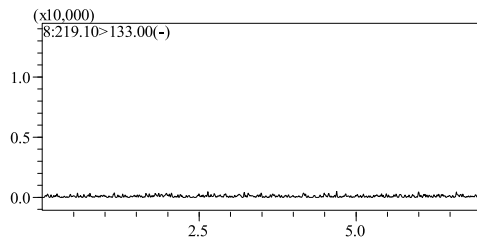


图5 等度条件不接延迟柱NP无系统残留

2.2 系统残留的排除

为排除 BPA 和 NP 的系统残留，本文采用增加延迟柱的办法。按照 1.2 条件，在混合器和自动进样器之间连接延迟柱 (见图 1)，为考察系统残留排除效果，分析测试了系统本底 (不进样只走梯度) 和标准溶液。结果 BPA 和 NP 的目标峰可与系统残留峰彻底分开，有效规避了系统残留对分析的影响。如下 BPA 色谱图 (图 6 和图 7) 和 NP 的色谱图 (图 8 和图 9)。

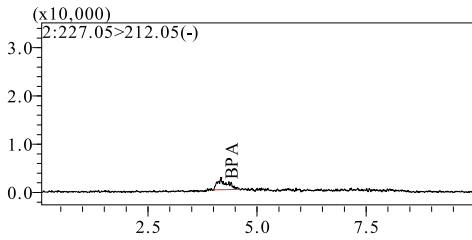


图6 BPA系统残留

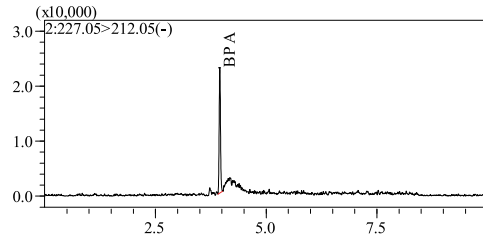


图7 BPA目标峰 (0.5 µg/L)

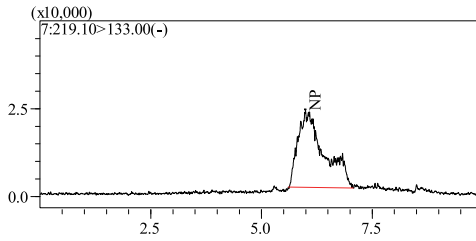


图8 NP系统残留

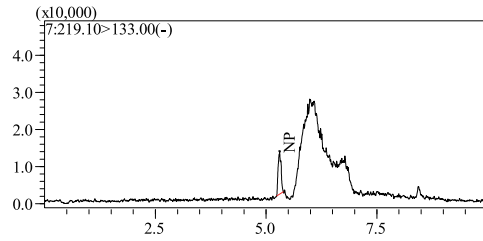


图9 NP目标峰 (0.5 µg/L)

2.3 MRM 色谱图

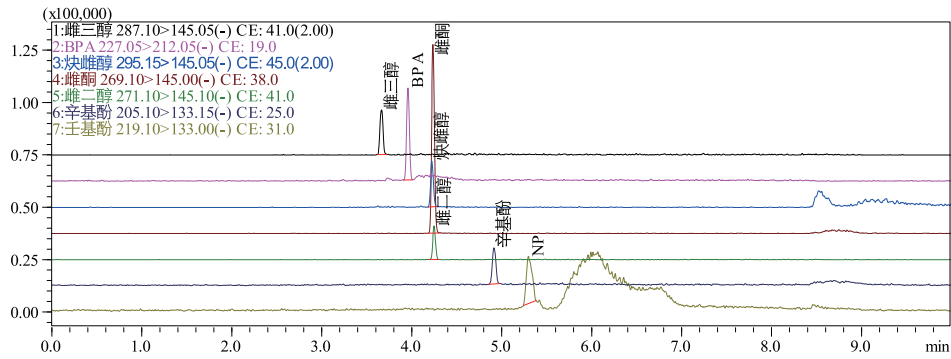


图10 EDCs的MRM色谱图 (1.0 µg/L)

2.4 线性关系

将浓度为 0.2(此浓度仅作为雌酮的校正点)、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0、100.0 µg/L 校正溶液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 11~17 所示。7 种激素在该浓度范围内线性良好，线性方程、线性范围、准确度、相关系数见表 3。

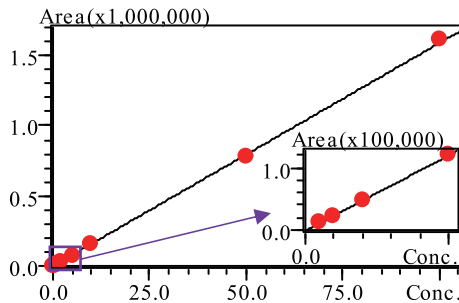


图11 雌二醇的标准工作曲线

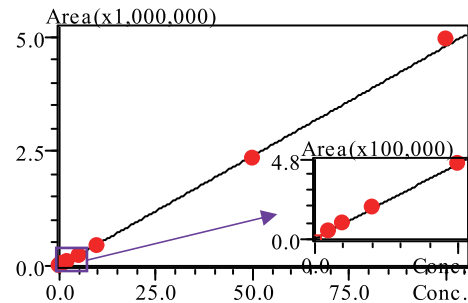


图12 BPA的标准工作曲线

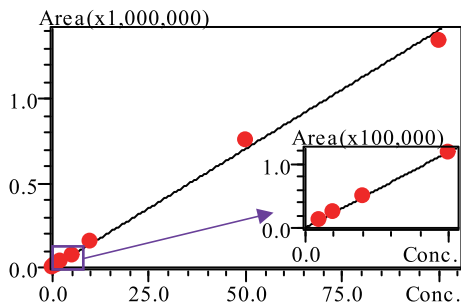


图13 炔雌醇的标准工作曲线

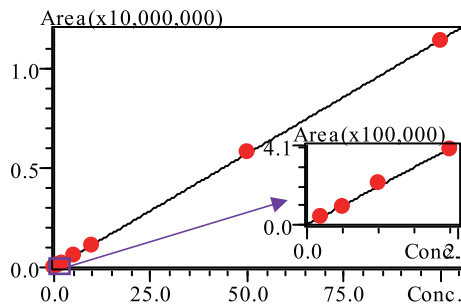


图14 雌酮的标准工作曲线

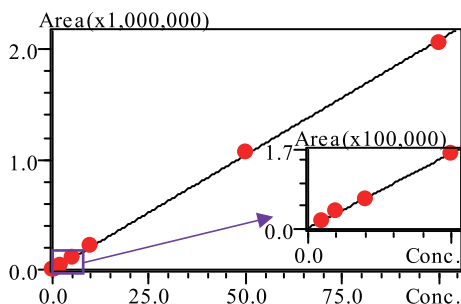


图15 雌二醇的标准工作曲线

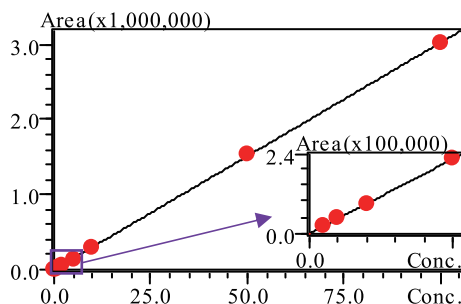


图16 辛基酚的标准工作曲线

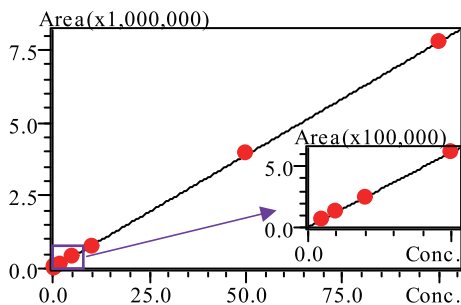


图17 壬基酚的标准工作曲线

表3 7种雌激素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	准确度 (%)	相关系数 r
1	雌三醇	$Y = (15919.5)X + (-1210.29)$	0.5-100	91.3-104.6	0.9996
2	BPA	$Y = (48027.3)X + (-323.412)$	0.5-100	98.9-102.5	0.9992
3	炔雌醇	$Y = (14084.1)X + (650.794)$	0.5-100	94.0-107.0	0.9990
4	雌酮	$Y = (114370)X + (-1313.84)$	0.2-100	96.0-108.5	0.9999
5	雌二醇	$Y = (20878.2)X + (-1193.29)$	0.5-100	98.3-112.0	0.9997
6	辛基酚	$Y = (30243.4)X + (-1427.40)$	0.5-100	98.3-108.6	0.9998
7	壬基酚	$Y = (77599.4)X + (6659.20)$	0.5-100	97.6-104.9	0.9999

2.4 Carryover 考察

在完成高浓度标准溶液分析后，测试空白溶液（初始比例流动相溶液），考察 Carryover 残留，结果显示无 Carryover，不影响测试。如图 18。

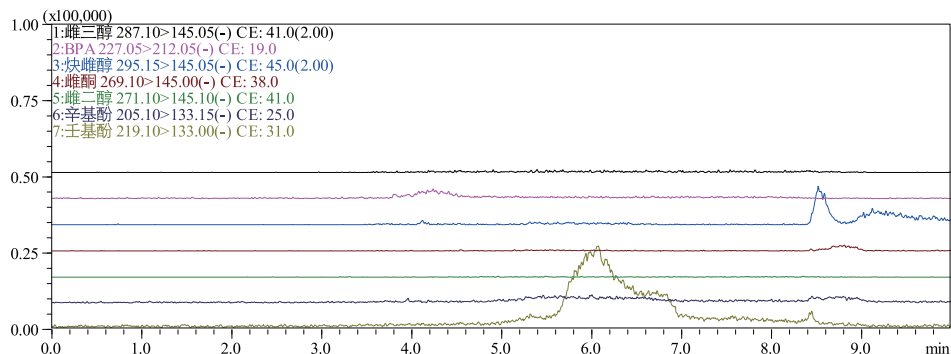


图18 空白溶液MRM色谱图

2.5 重复性实验

配制 7 个雌激素化合物混合溶液，浓度分别为 1.0 mg/L、5.0 mg/L 和 50 mg/L，平行测试 6 次。7 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.15% 和 0.82 ~ 4.90% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (1.0 µg/L)		RSD% (5.0 µg/L)		RSD% (50.0 µg/L)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
雌三醇	0.12	3.41	0.06	2.65	0.08	2.40
BPA	0.1	2.21	0.07	0.82	0.08	2.21
炔雌醇	0.09	4.45	0.07	2.67	0.06	2.21
雌酮	0.08	2.43	0.06	1.41	0.06	1.20
雌二醇	0.08	4.90	0.06	2.88	0.06	1.43
辛基酚	0.07	4.44	0.06	2.58	0.05	1.43
NP	0.15	3.43	0.07	2.45	0.06	1.30

2.6 灵敏度

配制如表 5 浓度的混合标样 7 份，直接进样分析，根据 HJ 168-2010 规定对上述测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 MDL=3.14×S，定量限 LOQ=4×MDL，测定结果如表 5 所示。

表6 加标样的回收率结果(n=3)

样品名称	回收率 (%)	
	1 µg/L	5 µg/L
雌三醇	90.5	93.0
BPA	83.5	89.0
炔雌醇	86.0	95.0
雌酮	87.0	94.5
雌二醇	88.0	96.0
辛基酚	90.0	91.3
NP	109.0	104.5

■ 结论

建立使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定水中 7 种环境雌激素的方法。通过使用杂质延迟法,消除了 BPA 和 NP 系统残留对检测的影响,从而提高了环境雌激素中 BPA 和 NP 的检测灵敏度。其中 7 种环境雌激素的线性良好,相关系数均大于 0.999,定量限为 0.16 µg/L~0.48 µg/L 之间,明显高于所参考的地方标准限值要求(仪器定量限 2.0 µg/L)。仪器的重复性良好,不同浓度水平混合标准溶液连续进样 6 次,保留时间和峰面积相对标准规偏差分别在 0.15% 和 4.90% 以下,空白基质加标回收率在 83.5%~109% 之间。本测试方法简单、快速、准确,可满足水中低浓度水平环境雌激素的检测要求。