

三重四极杆质谱测定环境水中的雌激素

LCMSMS-034

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定环境水中 8 种雌激素的方法。样品经超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 内标法进行定量分析。雌三醇、17-雌二醇、炔雌醇和雌酮在 1~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，17-雌二醇在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚在 0.5~500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.864%~4.843% 和 0.034%~0.638% 之间，仪器精密度良好；同时考察了地表水空白基质加标结果，结果显示 8 种样品在定量限上均有很好的响应。

关键词：雌激素 环境水 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

水环境是环境雌激素的最大储存库。雌激素在自然环境中难以被分解或失活，而是通过食物链传递进入各级动物体内，对雄性生殖系统产生不良影响。环境雌激素物质进入人体后，与人体正常分泌的激素竞争，结合细胞中的激素受体，造成人体激素过剩，内分泌系统紊乱，影响人体性激素的正常工作，出现各种机能障碍。环境激素已经成为继臭氧层、地球气候变暖之后的第三大环境问题。

上个世纪，世界各国均意识到了环境雌激素对环境和人类的危害，并进行了深入的研究。1995 年，丹麦环境厅（DEPA）做了男性生殖与雌性荷尔蒙之间的影响关系的报告；同年，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；1996 年日本化学工业会设立内分泌问题研究委员会，以研究雌激素对人类的影响。但是到目前为止，我国暂无检测环境水中雌激素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用，建立了快速准确测定地表水中雌激素的方法，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-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D. \times 75 mmL., 1.6 μm

流动相：A - 水；B - 甲醇 / 乙腈 = 1:1(v/v)

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 45%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 1.50 | Pumps | Pump B Conc. | 55 |
| 4.00 | Pumps | Pump B Conc. | 60 |
| 4.50 | Pumps | Pump B Conc. | 100 |
| 5.00 | Pumps | Pump B Conc. | 100 |
| 5.10 | Pumps | Pump B Conc. | 45 |
| 7.00 | Controller | Stop | |

质谱条件

分析仪器: LCMS-8030

离子源: ESI, 负离子扫描

离子源接口电压: -3.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 20 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 50 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

| 编号 | 名称 | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|----|-----------------------------------|--------|---------|----------------|-------|----------------|
| 1 | 雌三醇 | 287.30 | 171.20* | 22.0 | 40.0 | 16.0 |
| | | | 145.10 | 22.0 | 40.0 | 27.0 |
| 2 | 17 α -雌二醇 | 271.30 | 145.20* | 21.0 | 50.0 | 13.0 |
| | | | 183.05 | 21.0 | 45.0 | 18.0 |
| 3 | 17 β -雌二醇 | 271.30 | 145.10* | 20.0 | 45.0 | 24.0 |
| | | | 183.00 | 20.0 | 45.0 | 19.0 |
| 4 | 炔雌醇 | 295.30 | 145.20* | 11.0 | 50.0 | 26.0 |
| | | | 227.50 | 11.0 | 25.0 | 23.0 |
| 5 | 雌酮 | 269.30 | 145.15* | 20.0 | 40.0 | 28.0 |
| | | | 183.05 | 20.0 | 40.0 | 20.0 |
| 6 | 己烯雌酚 | 267.25 | 251.15* | 20.0 | 25.0 | 28.0 |
| | | | 237.10 | 20.0 | 30.0 | 25.0 |
| 7 | 己烷雌酚 | 269.25 | 134.20* | 10.0 | 15.0 | 26.0 |
| | | | 119.05 | 10.0 | 40.0 | 21.0 |
| 8 | 己二烯雌酚 | 265.25 | 93.10* | 20.0 | 25.0 | 17.0 |
| | | | 249.15 | 20.0 | 25.0 | 28.0 |
| 9 | 雌二醇- ¹³ C ₂ | 273.30 | 147.15 | 20.0 | 45.0 | 28.0 |
| 10 | 己烯雌酚-d ₈ | 275.30 | 245.15 | 21.0 | 30.0 | 27.0 |

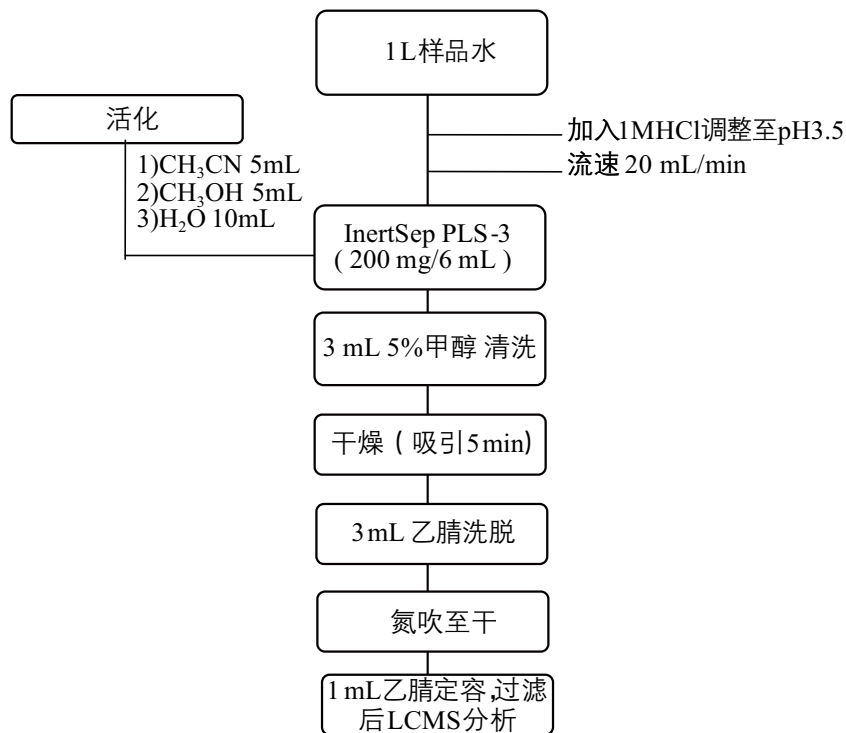
*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 100, 40, 20, 10, 5, 2, 1 和 0.5 g/L 的标准工作液，含有 10 g/L 的内标物质。

样品前处理方法如下：



结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

100 μg/L 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

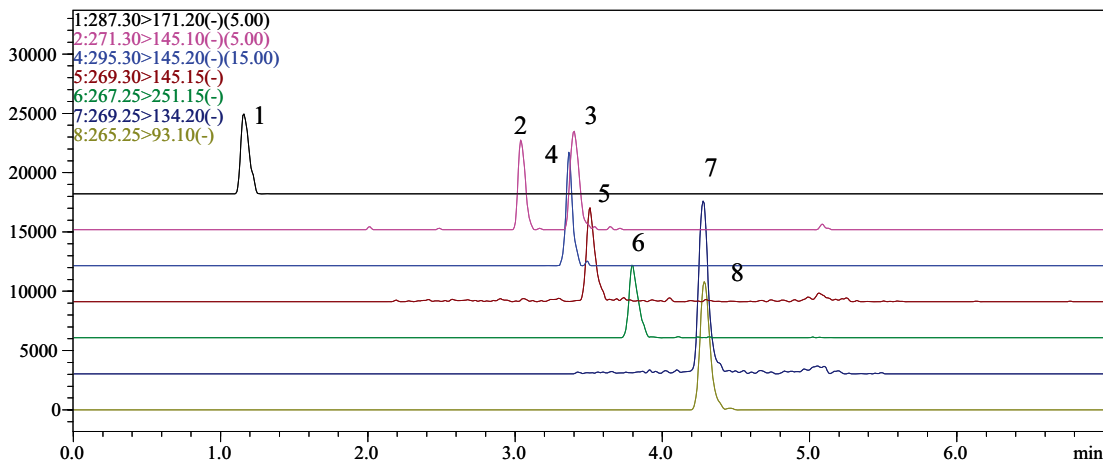


图 1 100 μg/L 混合标准样品的 MRM 色谱图

(1 雌三醇; 2 17β-雌二醇; 3 17α-雌二醇; 4 炔雌醇; 5 雌酮; 6 己烯雌酚; 7 己烷雌酚; 8 己二烯雌酚)

2.2 标准样品的扫描及产物离子扫描质谱图

8 种雌激素标准品的扫描 (SCAN, ESI-) 及产物离子扫描谱图如下所示。

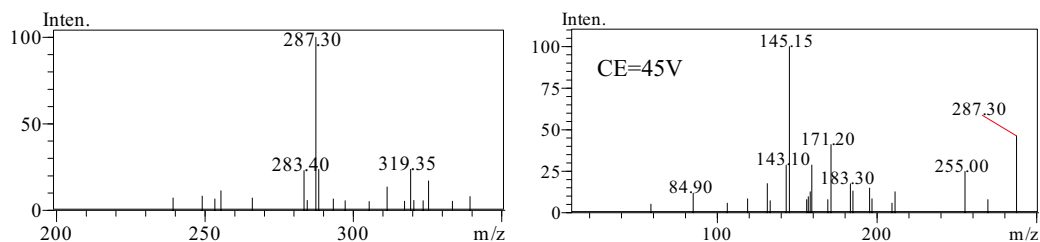


图2 雌三醇的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

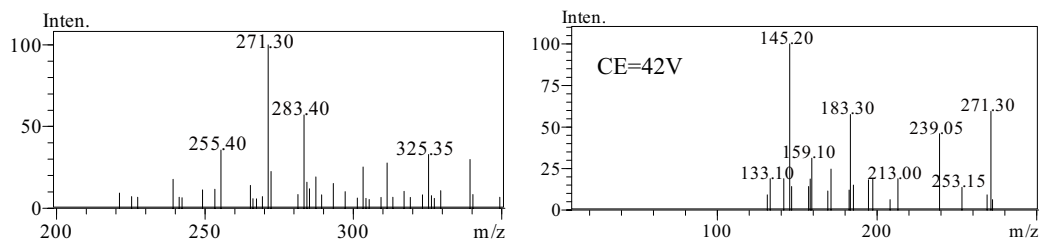


图3 17 α -雌二醇的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

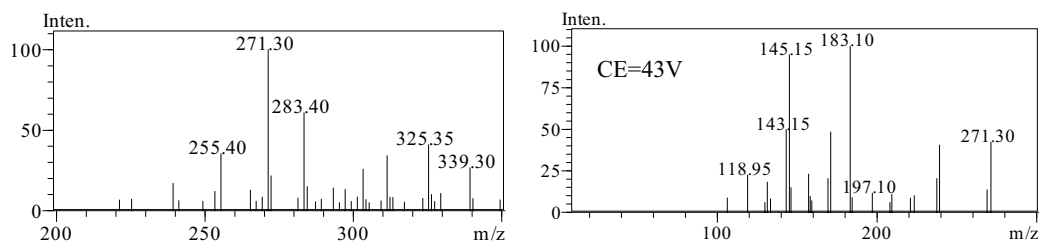


图4 17 β -雌二醇的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

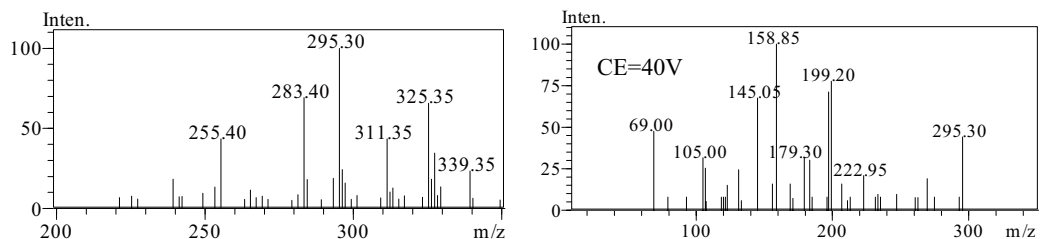


图5 雌酮的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

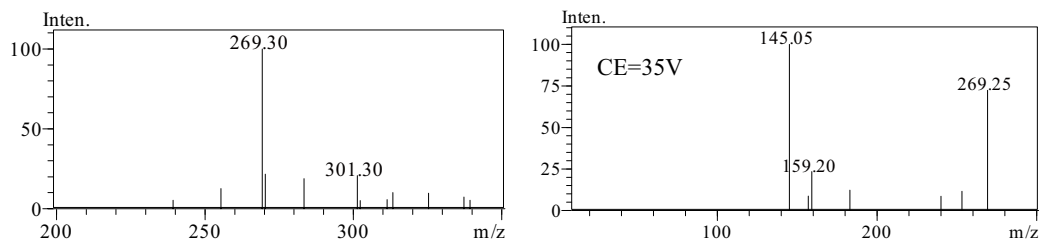


图6 雌酮的扫描 (左图) 及产物离子扫描 (右图) 谱图

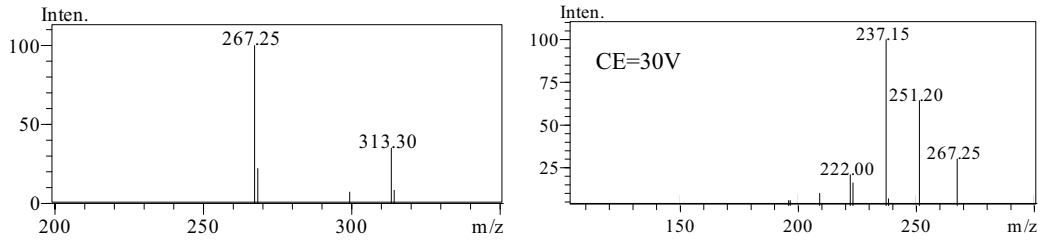


图7 己烯雌酚的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

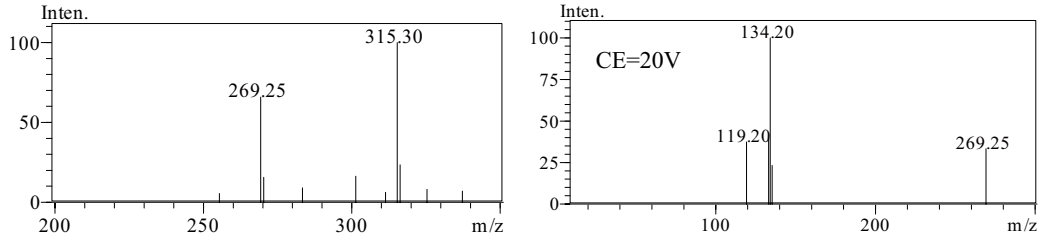


图8 己烷雌酚的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

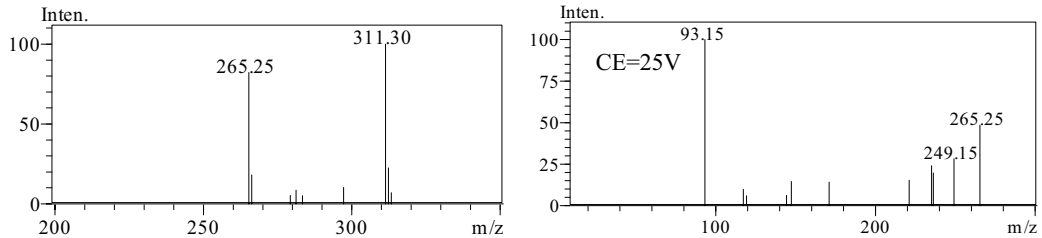


图9 己二烯雌酚的扫描（左图）及产物离子扫描（右图）谱图

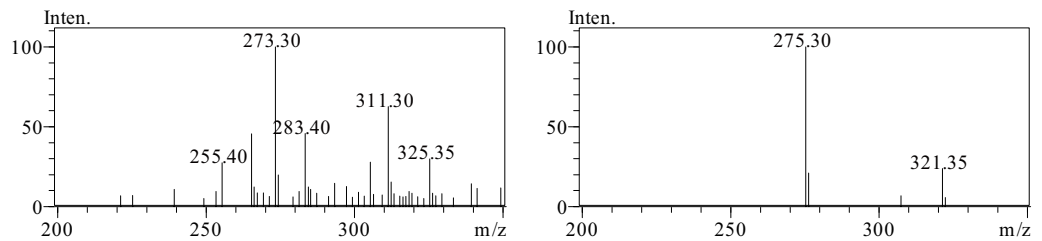


图10 雌二醇-¹³C₂（左图）和己烯雌酚-d₈（右图）的扫描谱图

2.3 线性关系

将浓度为 100, 40, 20, 10, 5, 2, 1 和 0.5 g/L 的混合标准工作液(含 10 g/L 的内标物质)按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线, 如图 11~18 所示。8 种激素在一定浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

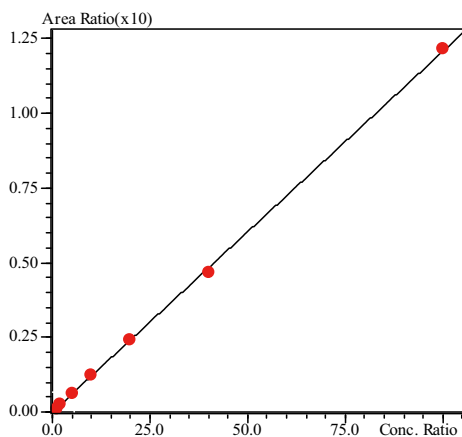


图11 雌三醇的标准工作曲线

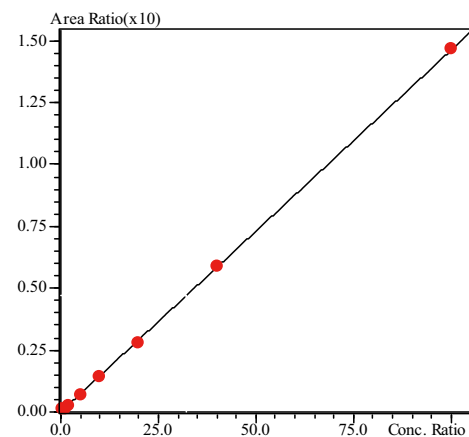


图12 17α-雌二醇的标准工作曲线

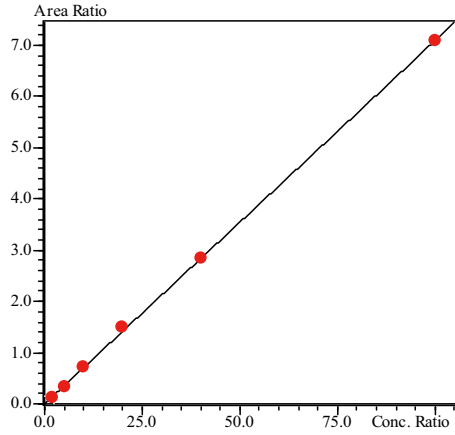


图 13 17β-雌二醇的标准工作曲线

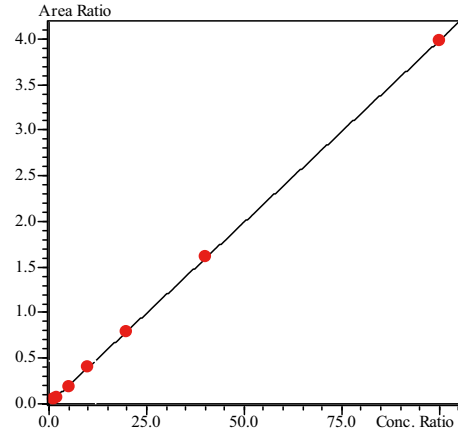


图 14 炔雌醇的标准工作曲线

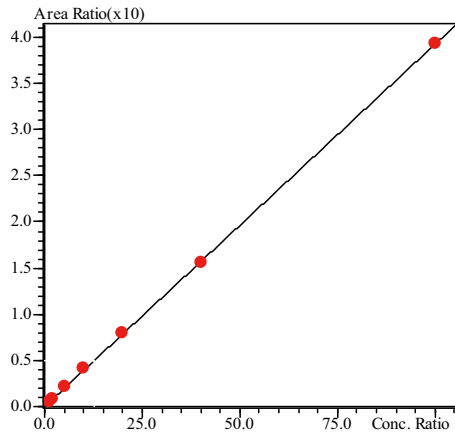


图 15 雌酮的标准工作曲线

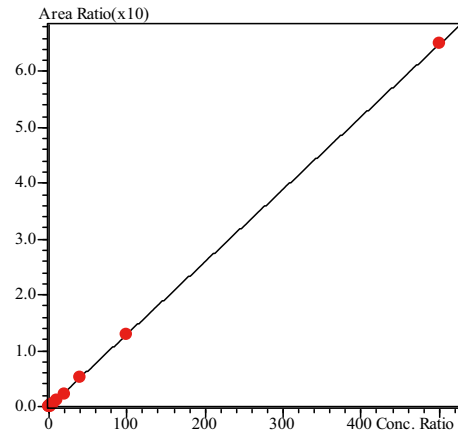


图 16 己烯雌酚的标准工作曲线

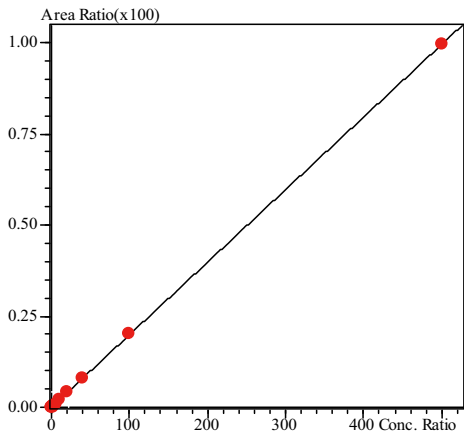


图 17 己烷雌酚的标准工作曲线

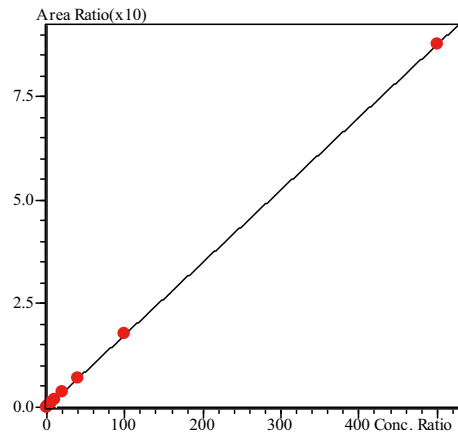


图 18 己二烯雌酚的标准工作曲线

表 3 8 种雌激素的校准曲线参数

| No. | 名称 | 校准曲线 | 相关系数 r | 线性范围 (µg/L) | 检出限 (µg/L) | 定量限 (µg/L) |
|-----|------------------|--------------------------|--------|-------------|------------|------------|
| 1 | 雌三醇 | $Y = (0.120659)X + (0)$ | 0.9998 | 1~100 | 0.05 | 0.15 |
| 2 | 17 α -雌二醇 | $Y = (0.146104)X + (0)$ | 0.9999 | 1~100 | 0.25 | 0.75 |
| 3 | 17 β -雌二醇 | $Y = (0.0709176)X + (0)$ | 0.9998 | 2~100 | 0.65 | 1.95 |
| 4 | 炔雌醇 | $Y = (0.039812)X + (0)$ | 0.9999 | 1~100 | 0.60 | 1.80 |
| 5 | 雌酮 | $Y = (0.392514)X + (0)$ | 0.9999 | 1~100 | 0.30 | 0.90 |
| 6 | 己烯雌酚 | $Y = (0.129798)X + (0)$ | 0.9999 | 0.5~500 | 0.15 | 0.45 |
| 7 | 己烷雌酚 | $Y = (0.199119)X + (0)$ | 0.9999 | 0.5~500 | 0.20 | 0.60 |
| 8 | 己二烯雌酚 | $Y = (0.175211)X + (0)$ | 0.9998 | 0.5~500 | 0.15 | 0.45 |

2.4 精密度实验

对 5 µg/L、10 µg/L 和 100 µg/L 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.864 ~ 4.843% 和 0.034 ~ 0.638% 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% (5 µg/L) | | RSD% (20 µg/L) | | RSD% (100 µg/L) | |
|------------------|-----------------|-------|------------------|-------|-------------------|-------|
| | Area | R.T | Area | R.T | Area | R.T |
| 雌三醇 | 3.160 | 0.638 | 2.448 | 0.135 | 1.801 | 0.122 |
| 17 α -雌二醇 | 4.236 | 0.323 | 1.318 | 0.084 | 1.852 | 0.053 |
| 17 β -雌二醇 | 4.843 | 0.240 | 4.354 | 0.080 | 1.816 | 0.057 |
| 炔雌醇 | 4.401 | 0.454 | 4.675 | 0.084 | 2.846 | 0.097 |
| 雌酮 | 4.007 | 0.241 | 1.818 | 0.051 | 1.146 | 0.051 |
| 己烯雌酚 | 4.753 | 0.271 | 0.929 | 0.079 | 0.864 | 0.059 |
| 己烷雌酚 | 2.372 | 0.034 | 0.868 | 0.080 | 1.463 | 0.057 |
| 己二烯雌酚 | 1.159 | 0.194 | 1.079 | 0.058 | 0.981 | 0.095 |

2.5 灵敏度考察

为了考察方法的灵敏度，在处理后的空白地表水样品中添加混合标样，其中 17-雌二醇和炔雌醇加标浓度为 2 µg/L；其他样品加标浓度为 1 µg/L，得到色谱图如图 19 所示。从图中可以看到，基质加标样品在定量限上均有很好的响应。

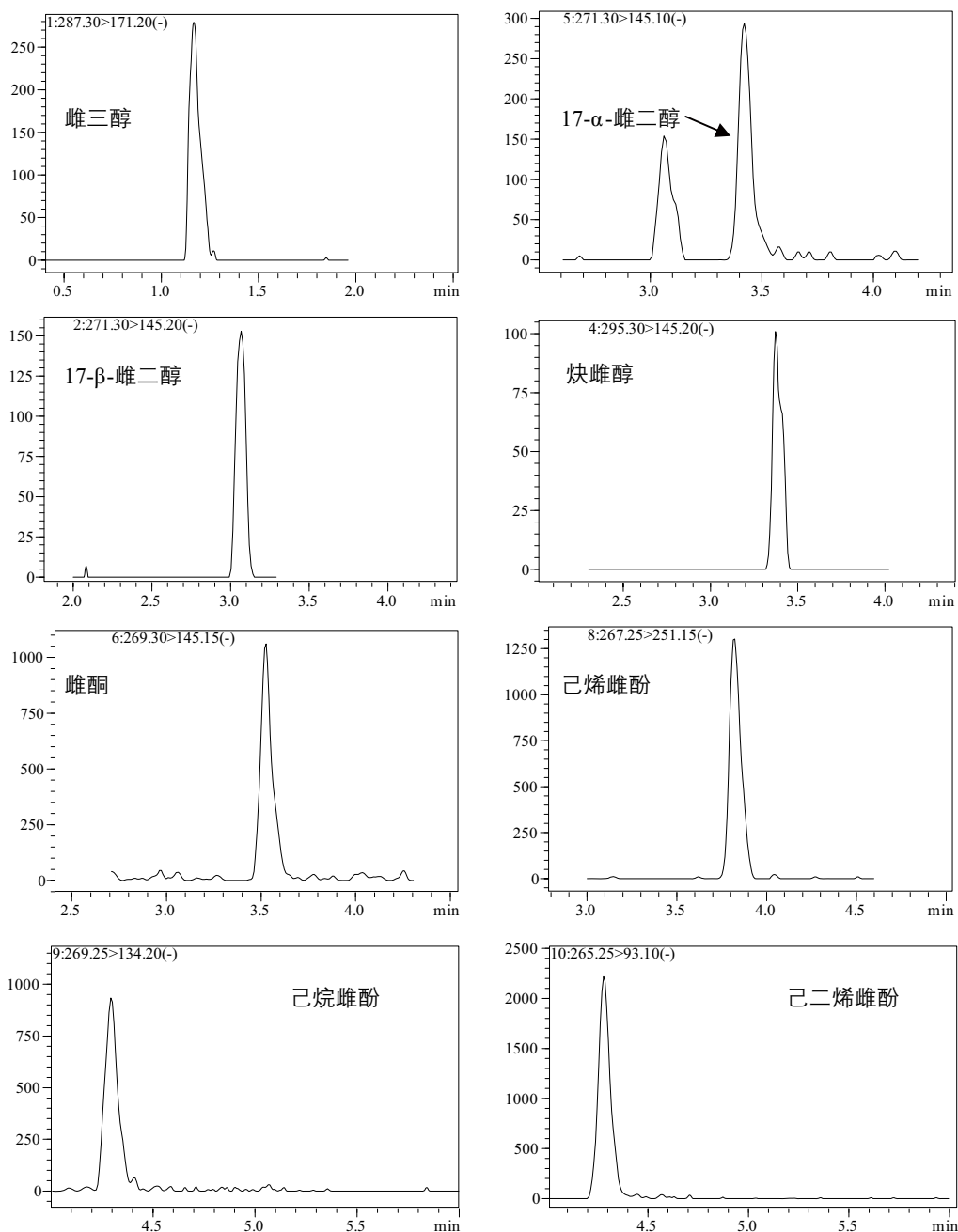


图19 地表水空白基质加标样品的色谱图

结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定环境水中 8 种雌激素的方法，该方法分析速度快，重复性和精密度良好。雌三醇、17-雌二醇、炔雌醇和雌酮在 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，17-雌二醇在 2 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚在 0.5 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.999 以上；在处理后的空白地表水样品中添加混合标样，基质加标样品在定量限上均有很好的响应。