



高灵敏度液相色谱 / 串联质谱分析河水中内分泌干扰物

Patricia Revilla-Ruiz¹ Gordon Keamey² Daniel McMillan²
Encarnación Rodríguez-Gonzalo¹
(1 萨拉曼卡大学, 萨拉曼卡, 西班牙; 2 沃特世公司, 曼彻斯特, 英国)

来自野生动物和实验室的证据表明, 一些化学物质可能对内分泌系统有干扰作用. 内分泌干扰物 (EDCs) 包括农药、多氯联苯 (PCBs)、二噁英、呋喃、烷基酚以及甾醇类雌激素 (天然生成及人工合成). 由于甾醇类雌激素对人体潜在的干扰性, 人们对其特别关注. 天然的性激素——雌二醇及其代谢产物 (雌酮和雌三醇) 以及合成的甾醇类乙烯雌二醇是由哺乳动物泌尿排泄, 在表层水和地下水中均有发现. 其它内分泌干扰物, 如烷基酚、壬基酚、双酚 A 以及五氯酚是工业和家庭活动的代谢产物, 在环境水体中也时有发生. 双酚 A 用于生产环氧树脂以及广泛用于食品和饮料包装的聚碳酸酯塑料. 壬基酚是非离子表面活性剂的衍生物, 被广泛用作增塑剂使用. 五氯酚在很多国家仍被作为一种重要的木材防腐剂使用.

这些化合物在环境中广泛存在, 需要开发高灵敏、高选择性的分析方法. 液相色谱串联质谱联用仪 (LC / MS / MS) 是一项可以分析不同基质和化合物的技术, 能够提供痕量分析所必需的高灵敏度. 通常选择电喷雾电离 (ESI) 负离子模式检测雌激素、烷基酚以及氯酚. 实验室和实际研究表明: 这些化合物在低于 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的水平下就对内分泌有干扰作用. 因此, 应先将水样富集. 固相萃取 (SPE) 是最为常见水样富集 EDCs 的技术.

本文介绍一种分析河水中 8 种内分泌干扰物的 SPE / LC / MS / MS 的灵敏方法.

1 分析方法

使用 Alliance 2690 HPLC 和 Micromass Quattro micro 质谱仪进行分析. 固相萃取小柱: 沃特世 Oasis[®] HLB (60mg). 活化: 3 ml 甲基叔丁基醚 (MTBE); 3 ml 甲醇; 3 ml 超高纯水. 进样量: 500 μl 河水 (用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸盐缓冲液调至 $\text{pH} = 3.0$). 清洗: 3 ml 40% 甲醇超高纯水溶液; 3 ml 超高纯水; 3 ml 10% 甲醇 / 2% 氨水水溶液. 提取: 6 ml 10% 甲醇 / MTBE 挥发: 50 $^{\circ}\text{C}$ 下 N_2 吹扫挥发近干. 定容: 500 μl (50:50, V / V , 乙腈 / 甲酸盐缓冲溶液, $\text{pH} 3.0$).

2 液相色谱条件

沃特世 Alliance 2690 HPLC 系统. 流动相 A: 甲醇, 流动相 B: 水; 色谱柱: 沃特世 SunFire[™] C₁₈, 2.1 $\times$ 50 mm, 3.5 μm 颗粒; 流速: $0.2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样体积: 20 μl ; 梯度洗脱: 起始 60% A, 40% B; 10 min, 100% A; 18 min, 100% A; 20 min, 60% A, 40% B; 23 min, 60% A, 40% B.

3 质谱条件

Micromass 串联四极杆质谱仪, 负离子化电喷雾电离模式, 电喷雾脱溶剂温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 氮气流速 450 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$. 源温 120 $^{\circ}\text{C}$, 毛细电压 3.2 kV. MRM 模式, 每种化合物的最佳锥孔电压和碰撞能量如表 1 所示.

表 1 MRM 参数

化合物	分子量	母离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	相关产物离子结构	锥体电压 /V	碰撞电压 /eV
雌二醇	288.4	287.3	144.9; 171.1	$[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_2]^-$; $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2]^-$	50	40
双酚 A	228.3	227.2	133.0; 210.8	$[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}]^-$	37	33
17 α -烯雌二醇	296.4	295.5	145.1; 199.5	$[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}]^-$; $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_9\text{O}]^-$	37	49
17 α -雌二醇	272.4	271.3	145.2; 183.1	$[\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}]^-$; $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}]^-$	37	45
17 β -雌二醇	272.4	271.3	145.2; 183.1	$[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}]^-$; $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}]^-$	37	45
雌酮	270.4	269.2	144.8; 143	$[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{12}\text{O}]^-$; $[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}]^-$	37	33
4- n -壬基酚	220.4	219.3	106.0; 118.7	$[\text{M}-\text{C}_8\text{H}_{17}]^-$; $[\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{17}]^-$	40	34
五氯酚	266.3	SR 264.9; 263.0; 267.1; 269.0			40	—

用于定量检测的离子使用黑体字标示. 对于五氯酚, 在更高的碰撞能量下也没有发现显著的碎片离子. 但是在全扫描模式下通过卤素的同位素比可以得到足够的结构信息. 因此, 对这种化合物可采用 SR 模式监测 4 个特征离子的方法. 使用沃特世 MasLynxTM 软件采集并使用 TargetLynxTM 处理数据.

4 结果和讨论

根据 8 种化合物的化学性质, 选择电喷雾负离子化模式 (ESI⁻) MS/MS 分析. 用反相色谱常用的两种有机溶剂甲醇和乙腈做流动相. 甲醇的本底质谱信号高于乙腈. 这可能是由于前者更易于挥发和离子化. 使用标准样品进样获得 LC/(ESI⁻) MS/MS 方法的校正曲线, 所有化合物的浓度和信号响应都具有良好的线性关系.

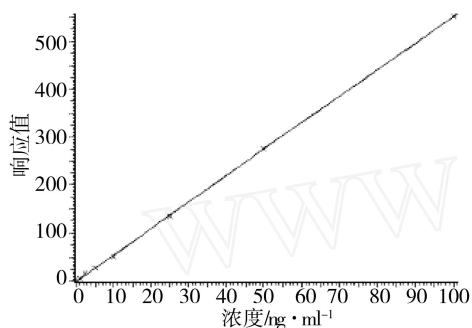


图 1 雌酮校正曲线图

图 1 给出了具有代表性的雌酮在浓度范围为 0.5—100 ng · ml⁻¹ 的标准曲线. 这条标准曲线是用溶剂空白及相应浓度标准检测绘制的.

图 2 给出的是在最低校正浓度下化合物的谱图. 仪器的标准品检出限 LODs (信噪比为 3:1) 分别是: 雌酮约为 0.6 ng · ml⁻¹, 五氯酚约为 0.5 ng · ml⁻¹, 17 α -雌二醇为 3 ng · ml⁻¹, 17 β -雌二醇为 5 ng · ml⁻¹, 双酚 A 为 10 ng · ml⁻¹,

4-正-壬基酚为 7 ng · ml⁻¹, 雌三醇为 5 ng · ml⁻¹, 17 α -乙烯雌二醇为 30 ng · ml⁻¹.

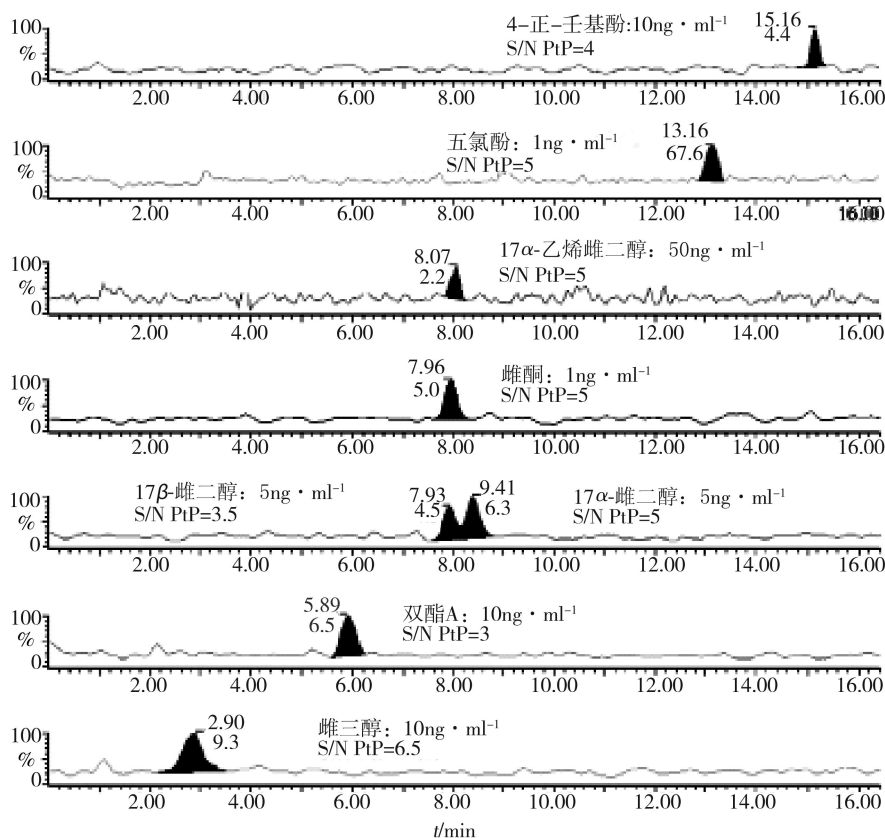


图 2 同仪器检出限相近的色谱峰谱图

为了获得对河水中这些化合物更灵敏的定量方法. 使用 Oasis HLB 小柱富集水样后, 测定. 首先评估了不同体积的河水样品在样品浓缩时是否会有基质抑制效应或没有保留.

结果表明响应信号与预浓缩体积直接相关. 因此, 河水样品的采样体积选择 500 ml 使用推荐的 SPE 方法富集样品得到了令人满意的回收率, 回收率范围为 74% (4-正-壬基酚) 到 105% (17 α -乙烯雌二醇).

使用本方法处理河水样品. 在分析未加标样品时发现了两种待测化合物: 双酚 A 和雌酮, 如图 3 所示.

使用内标加法测定河水样品中这两种化合物的浓度. 在标准添加实验中, 按四个浓度水平分别向样品中加入已

知剂量的目标化合物 (雌酮为 1, 2, 4和 8ng · l⁻¹; 双酚 A为 0.25, 5, 10和 20ng · l⁻¹). 从得到的校正曲线估算河水样品中的雌酮为 2 ±1 ng · l⁻¹, 双酚 A为 6 ±1 ng · l⁻¹.

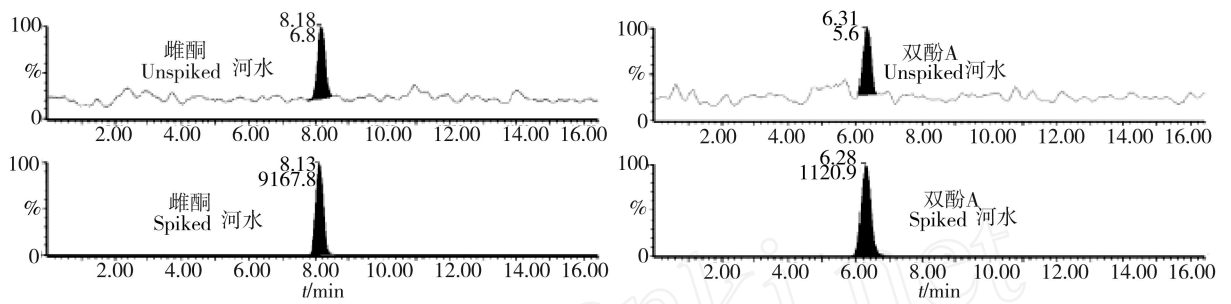


图 3 未加标河水样品中双酚 A和雌酮的谱图

图 4是添加了最低浓度的目标化合物 (不包括在未加标样品中存在的双酚 A和雌酮)后的河水样品经 SPE萃取后得到的色谱图. 从图 4可以看出, 河水的方法检出限 (信噪比 = 3 1)分别为雌酮 1 ng · l⁻¹, 五氯酚 0.6 ng · l⁻¹, 17α-雌二醇 2.5 ng · l⁻¹, 17β雌二醇 5 ng · l⁻¹, 双酚 A6ng · l⁻¹, 4-正壬基酚 9 ng · l⁻¹, 雌三醇 12ng · l⁻¹以及 17α 乙烯雌二醇为 50 ng · l⁻¹. 这个结果考虑到河水样品基质因数.

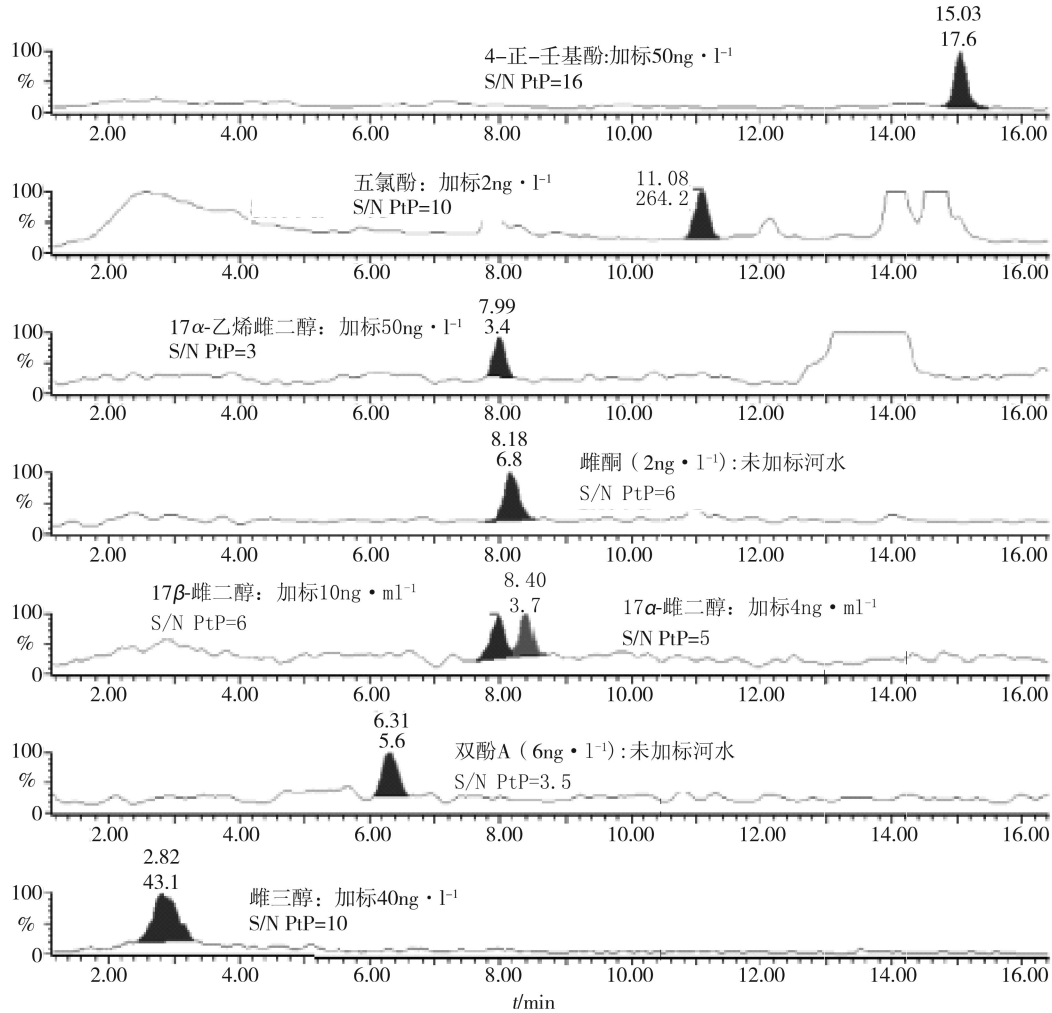


图 4 河水加标样品的谱图

5 结论

为检测河水中低于 ng · l⁻¹水平的 8种内分泌干扰物, 我们开发了高灵敏、高选择性的 LC / MS / MS方法. 通过样品前处理, 将水样浓缩 1000倍, 分析方法的灵敏度提高了 500—1000倍. 这说明 SPE方法对化合物具有很好的富集和净化作用, 最大限度地消除了基质的干扰. (参考文献略)