

固相萃取 - 高效液相色谱 - 质谱联用法用于地表水中类固醇激素测定

孙侑琳

(上海市环境监测中心, 上海 200235)

摘要:建立了固相萃取 - 高效液相色谱 - 质谱联用法对雌三醇、氟哌噻吨、炔雌醇、雄烯二酮、雌二醇、雌酚酮、睾酮共 7 种类固醇激素的检测方法。样品经 C18 萃取小柱富集净化, 采用内标法定量时, 方法的检出限为 0.66 ~ 1.95 ng/L, $R > 0.998$, 回收率为 78.5% ~ 94.6%, 相对标准偏差为 1.1% ~ 7.7%。采用该方法对上海市地表水进行测定, 在 2 个采样点中检出雌酚酮(1.88 ng/L)和雄烯二酮(1.48 ng/L)。

关键词:固相萃取; 高效液相色谱 - 质谱; 类固醇激素; 地表水

中图分类号: X832; 0657.63

文献标志码: B

文章编号: 1674-6732(2018)05-0026-04

Determination of Steroid Hormones in Surface Water by LC - MS/MS

SUN Zhou-lin

(Shanghai Environmental Monitoring Center, Shanghai 200235, China)

Abstract: A Solid - Phase Extraction and High - Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry technique was developed to simultaneously detect seven steroid hormones (Estriol, Equilin, 17α - Ethynylestradiol, 4 - Androstenedione, 17β - Estradiol, Estrone, Testosterone). The samples were purified and enriched by the SPE - C18 column. The internal standard method was adopted to quantify, the detection limit was between 0.66 ~ 1.95 ng/L, $R > 0.998$, recoveries was between 78.5% ~ 94.6%, RSD was between 1.1% ~ 7.7%. The proposed method was applied to analyze surface water samples in Shanghai. The trace concentrations were observed for Estrone (1.88 ng/L) and 4 - Androstenedione (1.48 ng/L) in two sampling points.

Key words: Solid-Phase Extraction; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry; Steroid hormone; Surface water

内分泌干扰物 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) 已引起世界各国的广泛关注。类固醇激素 (Steroid hormone) 包括雌激素 (Estrogen)、雄激素 (Androgens) 和皮质激素 (Corticoid), 其来源有天然源或合成源^[1-2]。目前我国污水处理厂废水^[3]、畜禽养殖场废水^[4]、生物体内^[5]、河流水体^[6-7]等均不同程度受到类固醇激素污染。北京 7 家污水处理厂进水废水中检出雌二醇和雌酚酮, 质量浓度为 0.76 ~ 8.7 ng/L^[3]。崇明岛 9 种水生生物体内雌激素质量比为 1.1 ~ 7.38 ng/g^[5]。太湖类固醇激素质量浓度为 0.86 ~ 116 ng/L^[6]。

低剂量的类固醇激素就会影响人体新陈代谢, 干扰激素平衡, 对生殖系统、神经系统和免疫系统造成严重损害^[8-9]。因此, 为了食品安全与人类健康, 对环境中的类固醇激素的监测具有重要意义。当前, 类固醇激素的检测方法主要有: 气相色谱 - 质

谱联用法 (GC - MS)^[10-11]、液相色谱 - 质谱联用法 (HPLC - MS)^[12-13] 和免疫分析法 (Immunoassay)^[14]。

现采用简单快速的固相萃取技术, 直接对地表水进行浓缩、富集、净化, 建立 7 种类固醇激素的高效液相色谱 - 质谱联用检测方法, 并对水样中的目标激素进行分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1290 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); 6460 型三重四级杆质谱仪 (美国 Agilent 公司), 配

收稿日期: 2018-05-24

基金项目: 上海市环保科研基金资助项目 (2015-82)

作者简介: 孙侑琳 (1988-), 女, 工程师, 硕士, 从事环境监测工作。

有喷射流技术的电喷雾电离源(AJS)及MassHunter Workstation 数据处理系统;C18 反相高效液相色谱柱(2.1 mm × 100 mm × 1.8 μm, 美国 Agilent 公司);Autotrace 全自动固相萃取仪(美国 Thermo Fisher 公司);氮吹仪(美国 Organomation 公司);针式氮吹浓缩仪(美国 OI 公司);Oasis HLB 200 mg 6cc 小柱(美国 Waters 公司);C18 小柱(美国 Agilent 公司)。

激素标准品:雌三醇(Estriol)、氟哌噻吨(Equilin)、炔雌醇(17α-Ethynylestradiol)、雄烯二酮(4-Androstenedione)、雌二醇(17β-Estradiol)、雌酚酮(Estrone)、睾酮(Testosterone)共7种激素类化合物标准贮备液(ρ = 1 000 mg/L, 美国 Absolute Standards 公司)。内标混合溶液:雌三醇-d₂(ρ = 2 mg/L, 美国 Absolute Standards 公司),¹³C₆-雌二醇(ρ = 4 mg/L, 公司同上),¹³C₂-炔雌醇(ρ = 4 mg/L, 美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司)和睾酮-d₃(ρ = 1 mg/L, 美国 Sigma 公司);替代物混合溶液:炔雌醇-d₄(ρ = 7 mg/L, 加拿大 CDN 公司),双酚 A-d₁₆(ρ = 2.5 mg/L, 美国 Supelco 公司)。

甲醇、水均为 LC-MS 级别(德国 Merck 公司);氟化铵(美国 Fluka 公司);0.47 μm 孔径玻璃纤维滤膜(美国 Whatman 公司)。

1.2 样品的采集、萃取与浓缩

每升水样加入 0.5 g Na₄EDTA,用棕色玻璃瓶避光低温保存。将水样过 0.47 μm 玻璃纤维滤膜去除颗粒物,用量筒取 1 L 水样注入烧杯中,加入 10 μL 替代物混合溶液,用固相萃取仪对水样进行前处理。依次用 10 mL 甲醇、10 mL 纯水预淋洗 C18 小柱后,以 5 mL/min 流速将水样通过小柱。上完样后,将小柱于氮气保护下干燥 10 min,最后用 4 mL 甲醇洗脱二次,收集洗脱液在 40℃ 下用氮气吹至近干,用甲醇/水(7/13, V/V)溶液定容至 1.0 mL,加入 5 μL 内标混合溶液封进进样小瓶,待固相萃取-高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)分析。

1.3 色谱与质谱条件

色谱条件: C18 液相色谱柱,柱温 40℃;流动相 A 为含 0.4 mmol 氟化铵的水溶液,流动相 B 为甲醇溶液;流速 0.3 mL/min;进样量 5.0 μL。梯度洗脱:起始 35% B;0~2 min,35%~55% B;2~5 min,55%~85% B;5~8 min,85%~90% B;8~

8.1 min,90%~35% B。

质谱条件:电喷雾源(AJS);采用动态多反应监测(DMRM);毛细管电压正负均为 3 500 V;源温度 300℃;鞘气温度 350℃;鞘气流速 11 L/min;喷嘴电压正负均为 500 V;雾化气压力 310.28 kPa。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理

比较 HLB 柱和 C18 柱的萃取效果,用回收率表示(表 1)。C18 柱的回收率为 75.9%~98.7%,HLB 柱的回收率为 66.0%~106.3%。考虑到回收率较低的炔雌醇和雌酚酮在 C18 柱上回收率更好,选择 C18 柱作为萃取小柱。C18 柱用于激素的检测,其提取效率与文献[15-16]基本一致。

表 1 目标物质的回收率(n = 3)

化合物	回收率/%	
	C18 柱	HLB 柱
雌三醇	98.7	106.3
氟哌噻吨	81.9	73.5
炔雌醇	75.9	66.0
雄烯二酮	94.8	98.3
雌二醇	82.7	73.2
雌酚酮	77.4	72.9
睾酮	87.3	82.2

2.2 监测条件

对各目标化合物空白加标质量浓度为 50 ng/L 的水样进行测定,各目标化合物、内标化合物和替代物的多离子反应监测条件见表 2,总离子流图见图 1。色谱分析时间(包括梯度洗脱后色谱系统的平衡时间)共 8.1 min。

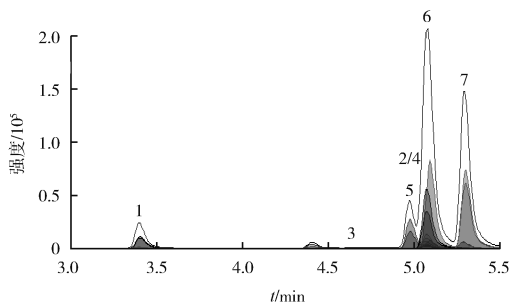
2.3 检出限、精密度与回收率测定

对 7 个目标化合物空白加标质量浓度为 10, 20, 50, 100, 200 和 500 ng/L 的水样进行测定,建立标准曲线,相关系数 R > 0.998,结果见表 3。

对 7 个目标化合物空白加标质量浓度为 4 ng/L 的水样(1L)进行测定,方法检出限由 7 次重复测定的标准偏差乘上 t 值(3.143)得到。方法精密度由分别测定 7 个激素类化合物 10 μg/L 标准溶液得到,相对标准偏差为 1.1%~7.7%。方法准确度由分别测定加入了质量浓度为 50 ng/L 的类固醇激素标准溶液的 7 个空白样品得到,回收率为 78.5%~94.6%,方法检出限、方法精密度和方法准确度结果见表 3。

表 2 加标水样中类固醇激素、替代物、内标物的多离子反应监测条件

化合物	母离子	子离子	保留时间/min	碎裂器电压/V	碰撞电压/V	加速电压/V	电离模式
雌三醇 - d ₂	289	147	3.5	151	29	4	-
		171	3.5	151	53	4	-
炔雌醇	295.1	269.1	5.1	140	25	4	-
		145.1	5.1	140	41	4	-
炔雌醇 - d ₄	299	273.1	5.1	141	25	4	-
		187	5.1	141	35	4	-
雌二醇	271.09	183.1	5.1	145	42	4	-
		145	5.1	145	38	4	-
雄烯二酮	287.1	109	5.1	100	26	7	+
		97.1	5.1	100	22	7	+
双酚 A - d ₁₆	241.1	223	4.5	103	17	4	-
		142.1	4.5	103	25	4	-
¹³ C ₆ - 雌二醇	277.1	244	5.1	156	37	4	-
		145	5.1	156	41	4	-
氟哌噻吨	267.09	223	5.0	120	30	4	-
		143	5.0	120	30	4	-
雌三醇	287.19	171	3.5	140	34	4	-
		145	3.5	140	38	4	-
雌酚酮	269.19	183	5.1	140	38	4	-
		145	5.1	140	38	4	-
¹³ C ₂ - 炔雌醇	297.1	199	5.1	151	41	4	-
		145	5.1	151	37	4	-
睾酮	289.1	109	5.3	100	26	7	+
		97.1	5.3	100	22	7	+
睾酮 - d ₃	292.1	109	5.3	100	26	7	+
		97.1	5.3	100	22	7	+



1. 雌三醇 3.428 min, 2. 氟哌噻吨 5.042 min, 3. 炔雌醇 4.636 min, 4. 雄烯二酮 5.078 min, 5. 雌二醇 4.981 min, 6. 雌酚酮 5.100 min, 7. 睾酮 5.304 min。

图 1 7 种类固醇激素总离子流图

2.4 样品测定

应用本方法分析了上海市某地表水实际样品中的类固醇激素,用编号形式表示样品,在自来水中未检出相关类固醇激素化合物。分别在两个地表水样品中检出雌酚酮(1.88 ng/L)和雄烯二酮(1.48 ng/L),其他均未检出。

雌酚酮具有较高的雌激素活性,其分布可能与有机质的迁移、施用畜禽粪便的土壤等有关。上海市河流与水源地中,雌酚酮检出质量浓度为 0.58 ~ 8.50 ng/L^[17],与本文基本一致;太湖水样中雌酚

表 3 7 种类固醇激素的线性方程、相关系数、检出限、相对标准偏差 (RSD) 和回收率

化合物	线性方程	线性范围/ (ng · L ⁻¹)	相关系数 R	检出限/ (ng · L ⁻¹)	RSD/ %	回收率/ %
雌三醇	$y = 0.88x + 0.032$	10 ~ 500	0.998 5	1.17	2.9	94.6
氟哌噻吨	$y = 2.05x - 0.002$	10 ~ 500	0.998 5	1.39	2.4	82.6
炔雌醇	$y = 1.09x + 0.004$	10 ~ 500	0.999 2	1.95	7.7	78.5
雄烯二酮	$y = 0.54x - 0.011$	10 ~ 500	0.999 5	1.11	1.1	91.5
雌二醇	$y = 1.04x - 0.007$	10 ~ 500	0.998 8	1.13	2.2	85.9
雌酚酮	$y = 6.35x - 0.029$	10 ~ 500	0.998 3	1.27	1.4	80.8
睾酮	$y = 0.74x + 0.018$	10 ~ 500	0.999 9	0.66	1.2	84.8

酮质量浓度为 0.22 ~ 0.60 ng/L^[6];滇池及其外流河中,雌酚酮质量浓度为 1.3 ~ 471.7 ng/L^[16];珠江广州段雌酚酮质量浓度为 2.5 ~ 8.2 ng/L^[18]。目前在太湖、滇池、珠江、松花江等水体中,已开展环境激素排放特征研究,雌酚酮、雌二醇和睾酮、炔雌醇等质量浓度一般在 ng/L 量级^[19]。

3 结语

采用 LC-MS/MS 方法分析了实际地表水样品中 7 种不同性质的类固醇激素,在 2 个点位检出类固醇激素(雄烯二酮和雌酚酮),质量浓度分别为 1.48 ng/L 和 1.88 ng/L。本方法能够满足地表水水体样品中类固醇激素多残留分析的要求,为相关内分泌干扰物污染治理工作和环境风险评估提供可借鉴的数据支撑。

[参考文献]

[1] YING G G, KOOKANA R S, RU Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment[J]. *Environment International*, 2002, 28(6): 545-551.

[2] MATTISON D R, NATALIYA K, MICHAEL G, et al. Pharmacokinetics and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: A review of the data and identification of knowledge gaps[J]. *Toxicology*, 2014, 44(8): 696-724.

[3] CHANG H, WAN Y, WU S M, et al. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens[J]. *Water Research*, 2011, 45: 732-740.

[4] HAN W, LI Y X, YANG M, et al. Presence and determination of manure-borne estrogens from dairy and beef cattle feeding operations in northeast China[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, 86: 465-469.

[5] 耿婧婧, 叶爱丽, 杨毅, 等. 崇明典型水生生物中雌激素含量和分布特征[J]. *环境科学*, 2014, 35(12): 4671-4677.

[6] ZHOU L J, ZHANG B B, ZHAO Y G, et al. Occurrence, spatio-temporal distribution, and ecological risks of steroids in a large shallow Chinese lake, Lake Taihu[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 557-558(1): 68-79.

[7] 梁栋, 宗栋良. 深圳主要河流中雌激素污染调查[J]. *环境监*

测管理与技术, 2013, 25(2): 29-32.

[8] 严炜, 林金明. 雌激素类内分泌干扰物的液相色谱-质谱分析样品前处理方法[J]. *分析化学*, 2010, 38(4): 598-606.

[9] HEIDI D N, MIRANDA W, BRNADETTE Z, et al. Menopausal hormone therapy for the primary prevention of chronic conditions: a systematic review to update the U. S. preventive services task force recommendations[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2012, 157(2): 104-113.

[10] 廖涛, 吴晓翠, 王少华, 等. 固相萃取-气相色谱/质谱联用法同时检测水体中 9 种环境雌激素[J]. *分析化学*, 2013, 41(3): 422-426.

[11] ZHOU Y Q, ZHOU J, XU Y P, et al. An alternative method for the determination of estrogens in surface water and wastewater treatment plant effluent using pre-column trimethylsilyl derivatization and gas chromatography/mass spectrometry[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2009, 158: 35-49.

[12] QIN F, ZHAO Y Y, MICHAEL B S, et al. Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 627(1): 91-98.

[13] 王和兴, 周颖, 姜庆五. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法同时分析奶粉中 9 种雌激素[J]. *分析化学*, 2011, 39(9): 1323-1328.

[14] 吴鹰, 孟艳玲, 周忠良. 环境内分泌干扰物对河川沙塘鳢的雌激素效应检测[J]. *环境监测管理与技术*, 2016, 18(6): 13-17, 40.

[15] 付银杰, 高彦征, 董长勋, 等. SPE-HPLC/FLD 法同时测定水中 4 种雌激素[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(11): 2296-2303.

[16] HUANG B, WANG B, REN D, et al. Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake catchment[J]. *China Environment International*, 2013, 59: 262-273.

[17] ZHANG H C, YU X J, YANG W C, et al. MCX based solid phase extraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 31 endocrine-disrupting compounds in surface water of Shanghai[J]. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879(28): 2998-3004.

[18] 龚剑, 冉勇, 杨余, 等. 珠江广州河段表层水中雌激素化合物的污染状况[J]. *环境化学*, 2008, 27(2): 242-244.

[19] 邵晓玲, 马军. 松花江水中 13 种内分泌干扰物的初步调查[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(9): 1910-1915.

· 简讯 ·

《土壤污染防治法》全票通过

8月31日下午,十三届全国人大常委会第五次会议举行了闭幕会,会议以171票赞成,全票通过了《土壤污染防治法》。这部法律规定,污染土壤损害国家利益、社会公共利益的,有关机关和组织可以依照《环境保护法》《民事诉讼法》《行政诉讼法》等法律的规定向人民法院提起诉讼。本法自2019年1月1日起施行。

这部法律的制定意义很重大:一是贯彻落实党中央有关土壤污染防治的决策部署。二是完善中国特色法律体系,尤其是生态环境保护、污染防治的法律制度体系。三是为我们国家开展土壤污染防治工作,扎实推进“净土保卫战”提供了法治保障。

摘自 www.hbt.jiangsu.gov.cn 2018-09-03