

LC-MS/MS 法测定海水中双酚 A 以及 9 种烷基酚的残留量

参考标准：《HJ1192-2021》

1 前言

双酚 A、双酚 B、辛基酚、壬基酚等内分泌干扰物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者抗天然激素的作用，故又称环境雌激素。将对机体的生殖、神经和免疫系统等造成危害，近年来已经成为水质安全的重要关注点。中华人民共和国国家生态环境标准《HJ1192-2021 水质 9 种烷基酚类化合物和双酚 A 的测定 固相萃取/高效液相色谱法》规定了此类内分泌干扰的高效液相色谱测定方法，然而相较于荧光检测器，液相色谱-串联质谱法的灵敏度高，选择性和特异性更好，能对低浓度的样品进行很好的定量分析检测。

本文建立了使用谱育科技的超高效液相色谱—三重四极杆串联质谱仪测定海水中双酚 A、4-叔丁基苯酚、4-丁基酚、4-戊基酚、4-己基酚、4-庚基酚、4-叔辛基酚、4-辛基酚、4-支链壬基酚、4-壬基酚的快速且高灵敏度的检测方法。

2. 实验部分

2.1 标准品、试剂和设备

标准品：双酚 A 以及 9 种烷基酚标准品混合溶液购自上海安谱科技股份有限公司，于-20℃冰箱保存。

试剂：甲醇为色谱级、二氯甲烷为色谱级、氨水为色谱级。

仪器：ULC 510 超高效液相色谱仪（具体配有二元超高压输液泵、超高压自动进样器、柱温箱）、EXPEC 5210 三重四极杆串联质谱仪。



2.2 液相和质谱条件

LC 条件	流动相	0.002%氨水溶液 (A) 和甲醇 (B), 梯度洗脱		
	流速	0.3mL/min		
	色谱柱	CNWShell C18 (2.1 x 100mm, 2.6 μ m)		
	进样量	10 μ L		
	运行时间	11min		
	梯度方法	Time (min)	A (%)	B (%)
		0	60	40
		1.1	60	40
3		40	60	
7		5	95	
9		5	95	
11		40	60	
MS 条件	运行模式	ESI-		
	毛细管高压	-4.0kV		
	去溶剂气流量	6.0L/min		
	反吹气流量	2.0L/min		
	去溶剂气温度	500 $^{\circ}$ C		
	碰撞气流量	0.35mL/min		
	雾化气流量	1.2L/min		

监测模式为多反应监测(MRM), 各化合物监测离子对、碰撞电压(CE)等参数见下表。

方法片段信息	开始时间(min)	结束时间(min)	离子化模式	扫描模式	化合物名称	母离子质量	子离子质量	驻留时间(s)	锥孔电压	碰撞能量	分辨率
1	0	5	ESI-	MRM	双酚A	227.05	212.1	0.1	50	18	Unit-CID_Unit
2	5	6	ESI-	MRM	双酚A	227.05	133.07	0.1	50	26	Unit-CID_Unit
3	6	6.6	ESI-	MRM	双酚A-D4	231.05	216.1	0.1	50	18	Unit-CID_Unit
4	6.6	11	ESI-	MRM	双酚A-D4	231.05	135.07	0.1	50	26	Unit-CID_Unit

The figure displays three screenshots of a chromatography software interface, likely for a GC-MS system. Each screenshot shows a '方法片段信息' (Method Segment Information) table on the left and a '数据表' (Data Table) on the right. The data tables list various compounds with their retention times, ion masses, and other parameters.

Screenshot 1 (Top): Method parameters: 循环时间 0.51, 空白时间 5, Delay时间 5. Scan interval: 0.02 s. Data table shows 6 entries for 4-叔丁基苯酚 (4-tert-butylphenol) with retention times ranging from 126 to 149.15 minutes.

Screenshot 2 (Middle): Method parameters: 循环时间 0.31, 空白时间 5, Delay时间 5. Scan interval: 0.05 s. Data table shows 2 entries for 4-戊基酚 (4-pentylphenol) with retention times 163.15 and 119 minutes.

Screenshot 3 (Bottom): Method parameters: 循环时间 0.455, 空白时间 5, Delay时间 5. Scan interval: 0.01 s. Data table shows 13 entries for various compounds including 4-己基酚 (4-hexylphenol), 4-庚基酚 (4-heptylphenol), 4-辛基酚 (4-octylphenol), 4-壬基酚 (4-nonylphenol), 4-癸基酚 (4-decylphenol), 4-十一基酚 (4-undecylphenol), 4-十二基酚 (4-dodecylphenol), and 4-叔辛基苯酚 (4-tert-octylphenol) with retention times ranging from 211.2 to 223.2 minutes.

2.3 样品前处理

取海水 100mL, 使用盐酸溶液调节水样的 pH 为 2. 依次使用 10mL 甲醇、10mL 实验室纯水活化固相萃取小柱 (500mg, 6mL), 将过滤后的样品以 3 ml/min~5 ml/min 的流速通过固相萃取柱。上样结束后, 用 10 ml 实验室纯水淋洗固相萃取柱, 去除固相萃取柱上的杂质, 然后抽干固相萃取柱, 再以 2 ml/min~4 ml/min 的流速, 分别用 5 ml 甲醇和 5 ml 二氯甲烷洗脱, 收集洗脱液至 15mL 离心管中, 40℃氮吹至近干。用甲醇定容至 1mL, 过 0.22um 滤膜后待测。

3. 结果

3.1 线性和检出限

用甲醇稀释得到一系列浓度的混标溶液, 按照上述方法进样, 以各目标物的定量离子色谱峰面积为纵坐标(Y), 目标物标准溶液的质量浓度(X)为横坐标, 采用外标法拟合后的标准曲线部分如下所示, 具体线性方程以及浓度范围见表 1。线性 1 标品的 MRM 叠加色谱图如图 8 所示。配置线性 1 浓度标准溶液进样, 按照 S/N=10 和 S/N=3 计算定量限和检出限, 结果如下表 2 所示。

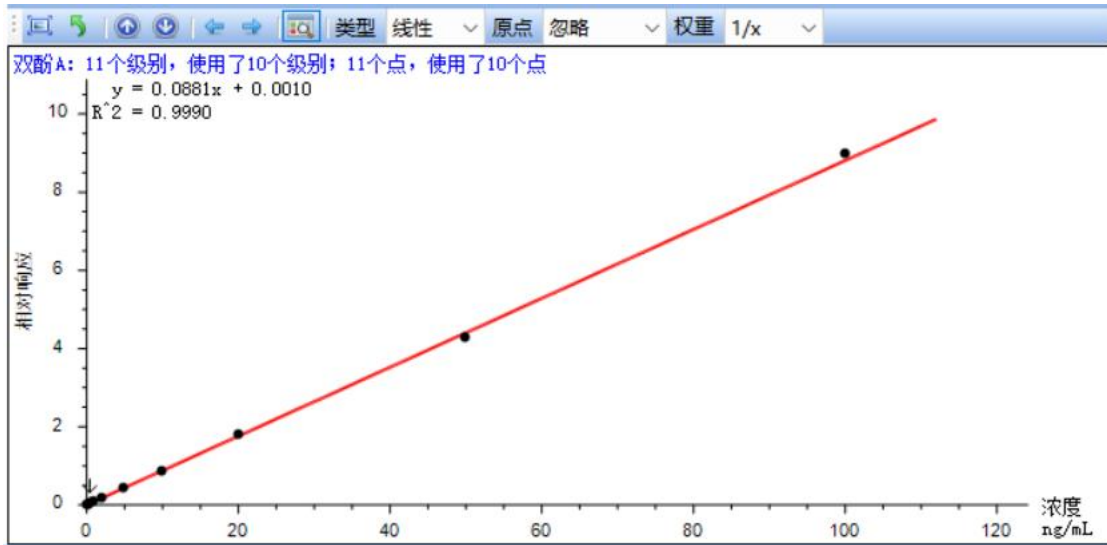


图1 双酚 A 标准曲线

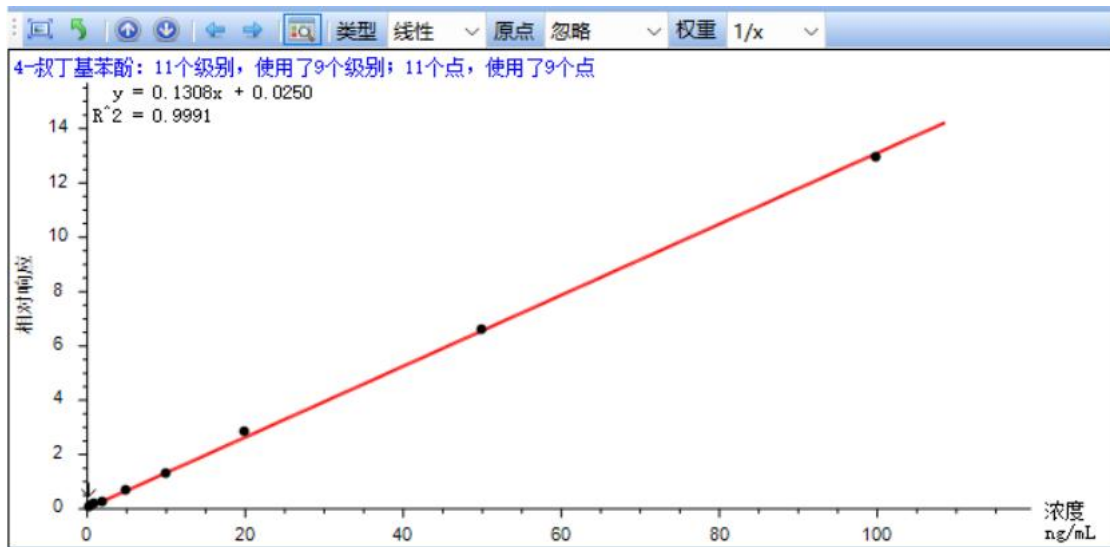


图2 4-叔丁基苯酚标准曲线

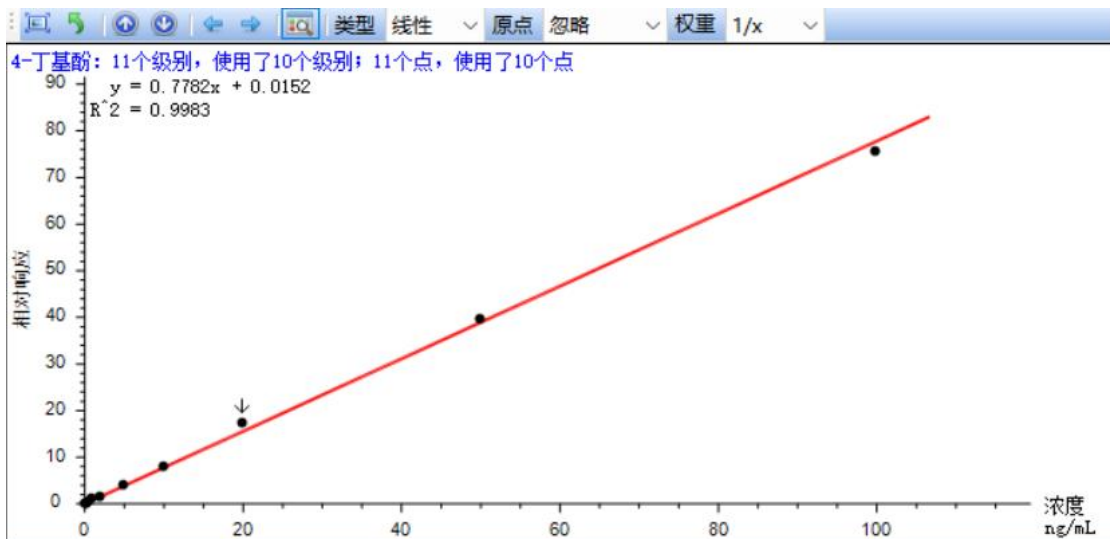


图3 4-丁基苯酚标准曲线

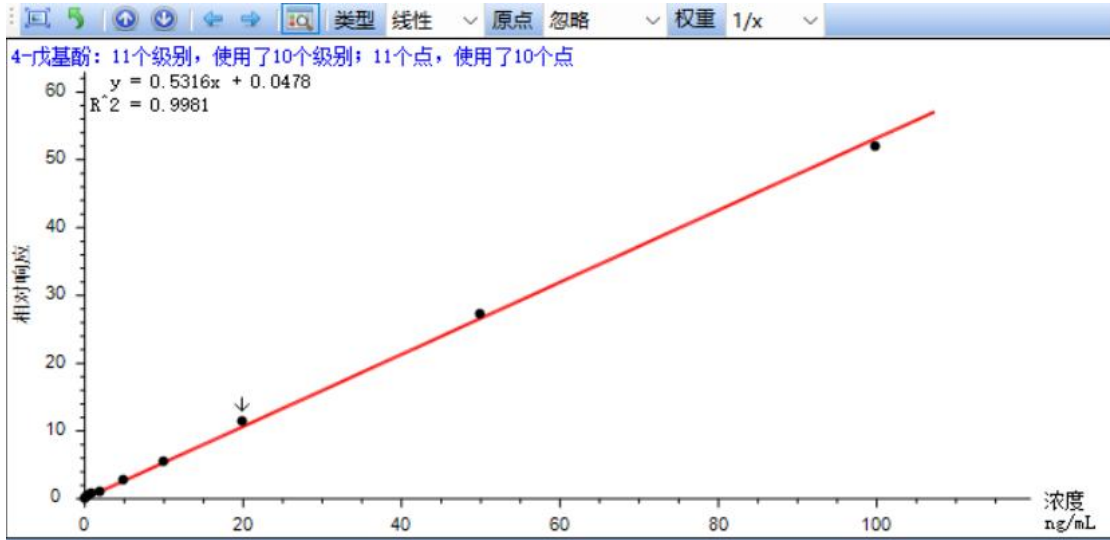


图4 4-戊基苯酚标准曲线

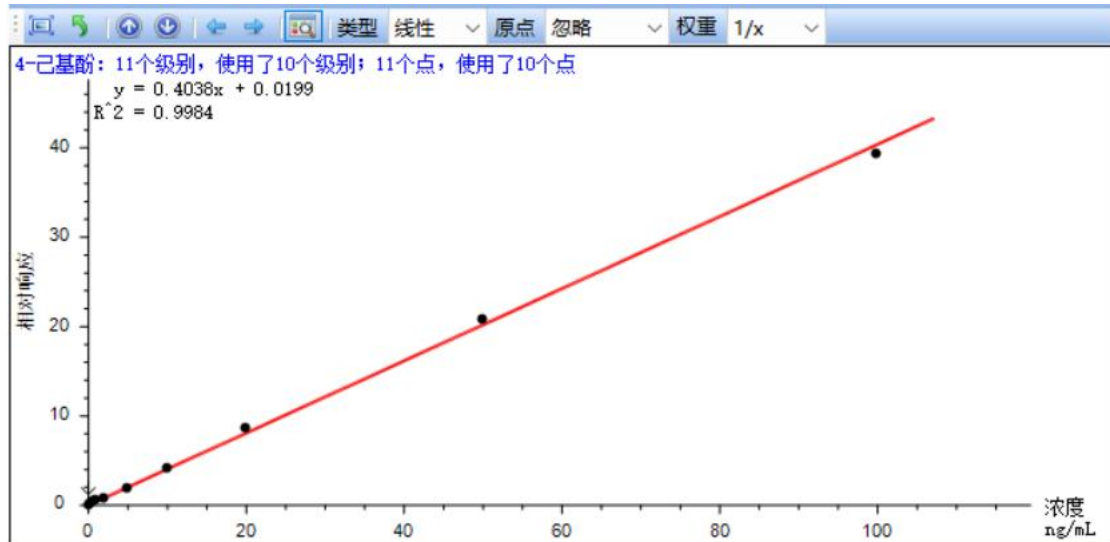


图5 4-己基苯酚标准曲线

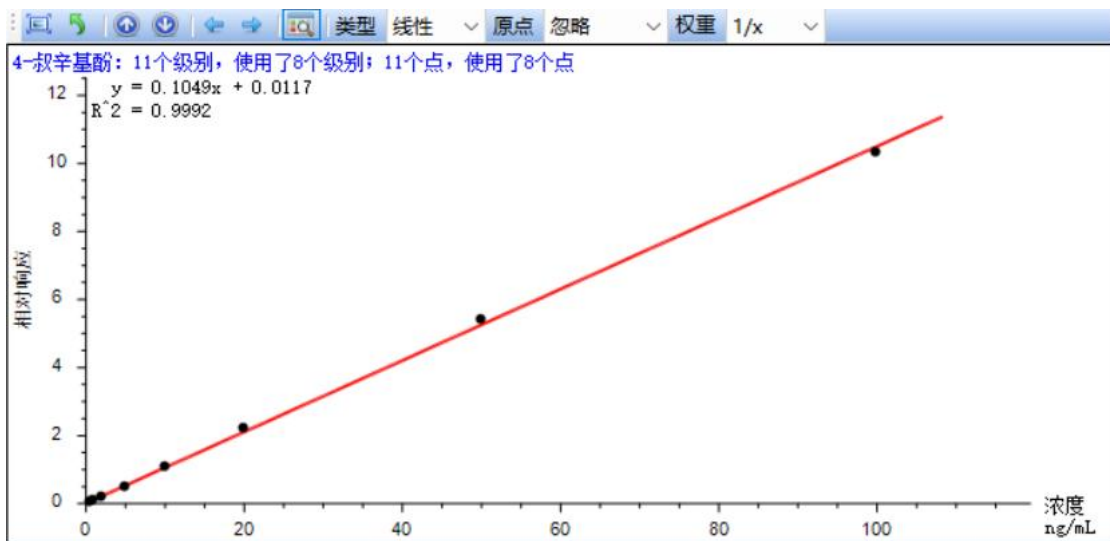


图6 4-叔辛基苯酚标准曲线

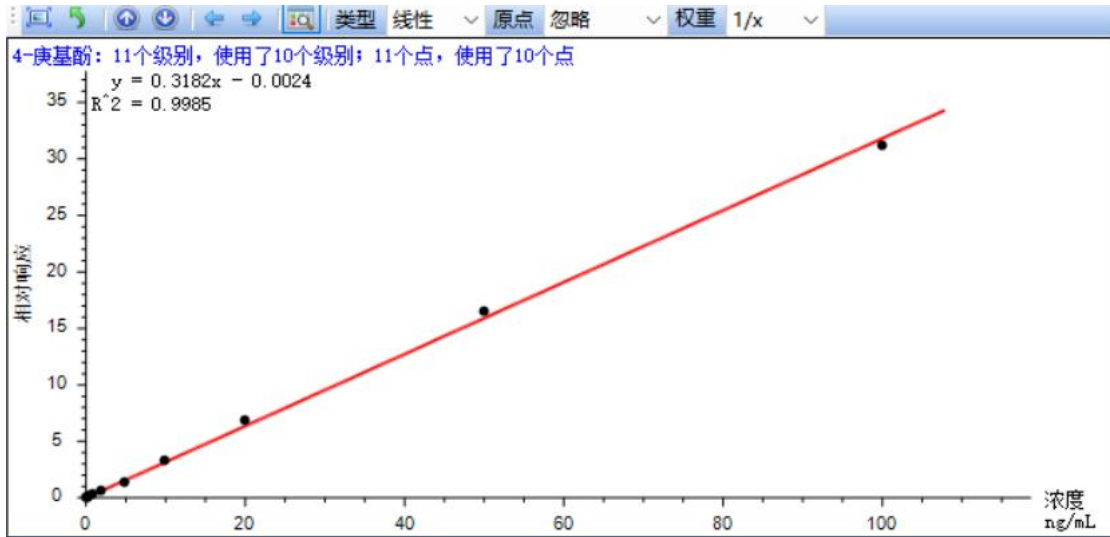


图7 4-庚基苯酚标准曲线

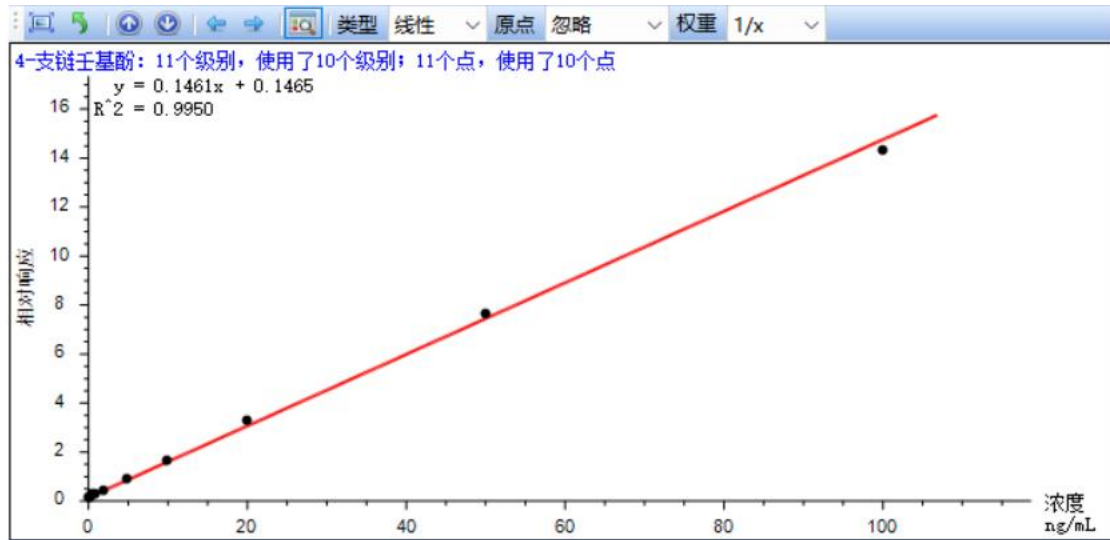


图8 4-支链壬基酚标准曲线

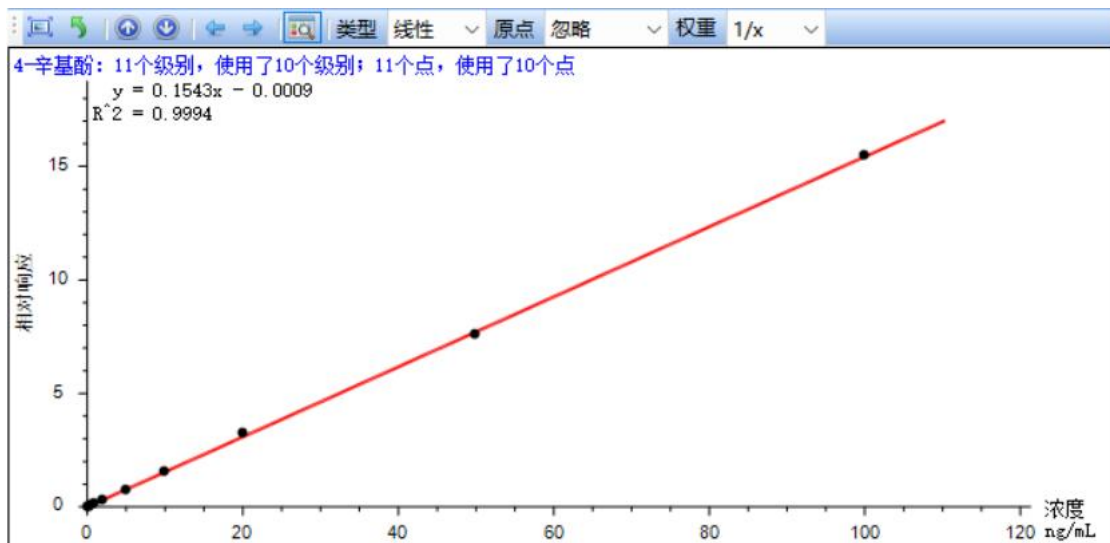


图9 4-辛基苯酚标准曲线

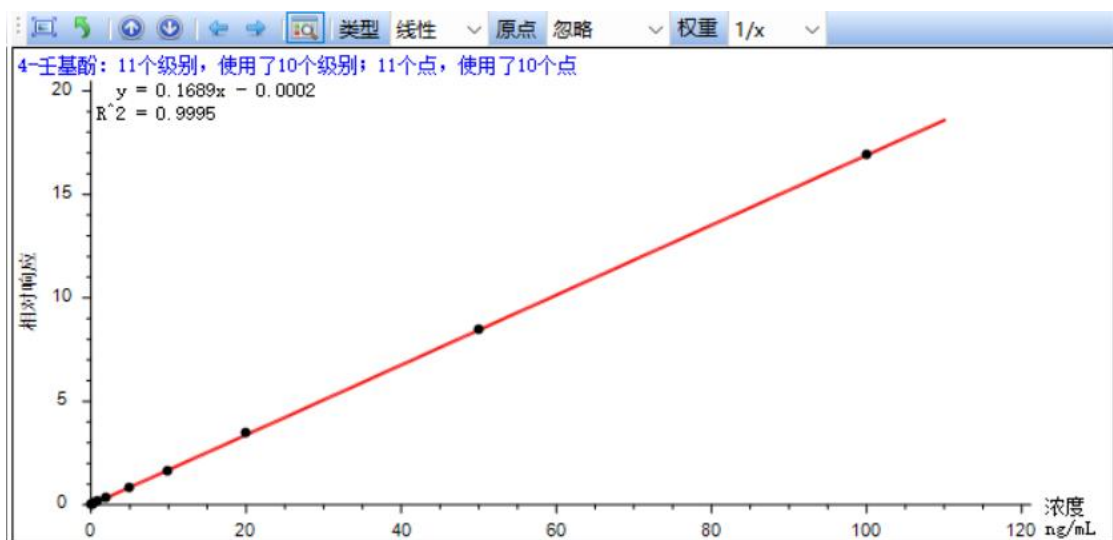


图 10 4-壬基苯酚标准曲线

表 1 双酚 A 以及 9 种烷基酚的线性信息

序号	化合物名称	拟合曲线方程	相关系数 r	浓度范围(ng/ml)
1	双酚 A	$y = 0.0881x + 0.0010$	0.9995	0.1-100
2	4-叔丁基苯酚	$y = 0.1308x + 0.0250$	0.9995	0.2-100
3	4-丁基酚	$y = 0.7782x + 0.0152$	0.9991	0.1-100
4	4-戊基酚	$y = 0.5316x + 0.0478$	0.9990	0.1-100
5	4-己基酚	$y = 0.4038x + 0.0199$	0.9992	0.1-100
6	4-庚基酚	$y = 0.3182x - 0.0024$	0.9992	0.1-100
7	4-叔辛基酚	$y = 0.1049x + 0.0117$	0.9996	0.5-100
8	4-辛基酚	$y = 0.1543x - 0.0009$	0.9997	0.1-100
9	4-支链壬基酚	$y = 0.1461x + 0.1465$	0.9975	0.1-100
10	4-壬基酚	$y = 0.1689x - 0.0002$	0.9998	0.1-100

5ppb 重复性:

样品信息				双酚A-D4		双酚A		4-叔丁基苯酚-D13		4-叔丁基苯酚		4-丁基苯酚		4-戊基苯酚		4-己基苯酚		4-庚基苯酚		
↓	↑	数据文件	采集时间	定量方法	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积
1	▼	5ppb-2	2023-05-30 23:09	烷基酚标准-内标法	4.61	759039.60	4.63	0.42	5.26	180956.60	5.33	0.66	5.74	0.94	6.36	1.24	6.88	0.91	7.12	0.49
2		5ppb-3	2023-05-30 23:21	烷基酚标准-内标法	4.61	778984.40	4.63	0.42	5.26	186490.50	5.33	0.65	5.74	0.93	6.36	1.22	6.88	0.91	7.12	0.51
3		5ppb-4	2023-05-30 23:33	烷基酚标准-内标法	4.61	752170.80	4.63	0.44	5.26	184236.50	5.33	0.65	5.74	0.95	6.36	1.26	6.88	0.95	7.12	0.53
4		5ppb-5	2023-05-30 23:45	烷基酚标准-内标法	4.60	755341.60	4.62	0.41	5.26	184038.80	5.32	0.69	5.73	0.94	6.35	1.27	6.88	0.96	7.12	0.52
5		5ppb-6	2023-05-30 23:57	烷基酚标准-内标法	4.61	760139.50	4.63	0.42	5.26	189463.10	5.33	0.66	5.74	0.95	6.36	1.25	6.89	0.95	7.12	0.51
6		5ppb-7	2023-05-31 00:09	烷基酚标准-内标法	4.61	765571.40	4.63	0.42	5.26	181090.50	5.33	0.67	5.74	0.95	6.36	1.25	6.88	0.96	7.12	0.50
Mn					4.60	752170.80	4.62	0.41	5.26	180956.60	5.32	0.65	5.73	0.93	6.35	1.22	6.88	0.91	7.12	0.49
Max					4.61	778984.40	4.63	0.44	5.26	189463.10	5.33	0.69	5.74	0.95	6.36	1.27	6.89	0.96	7.12	0.53
AVG					4.61	761874.60	4.63	0.42	5.26	184379.30	5.33	0.66	5.74	0.94	6.36	1.25	6.88	0.94	7.12	0.51
SD					0.00	9532.07	0.00	0.01	0.00	3254.83	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.01
▶ RSD					0.07	1.25	0.08	2.33	0.05	1.77	0.06	2.50	0.04	0.84	0.05	1.32	0.04	2.54	0.04	2.35
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

样品信息				4-叔辛基苯酚-13C6		4-庚基苯酚		4-支链壬基苯酚		4-辛基苯酚-D17		4-辛基苯酚		4-n-壬基苯酚-D5		4-壬基苯酚		
↓	↑	数据文件	采集时间	定量方法	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积
1	▼	5ppb-2	2023-05-30 23:09	烷基酚标准-内标法	7.12	360838.80	7.32	0.91	7.57	1.05	7.63	555449.90	7.68	0.72	7.97	603475.60	7.98	0.82
2		5ppb-3	2023-05-30 23:21	烷基酚标准-内标法	7.11	364788.70	7.31	0.95	7.57	1.14	7.63	594275.40	7.68	0.74	7.97	674940.20	7.98	0.79
3		5ppb-4	2023-05-30 23:33	烷基酚标准-内标法	7.12	356829.30	7.32	0.91	7.56	1.02	7.63	585512.40	7.68	0.70	7.97	656202.80	7.98	0.80
4		5ppb-5	2023-05-30 23:45	烷基酚标准-内标法	7.11	367922.60	7.31	0.94	7.55	1.16	7.62	595498.50	7.67	0.72	7.96	635409.80	7.97	0.82
5		5ppb-6	2023-05-30 23:57	烷基酚标准-内标法	7.12	345929.90	7.32	0.89	7.57	1.10	7.63	600721.30	7.68	0.70	7.97	643480.80	7.98	0.81
6		5ppb-7	2023-05-31 00:09	烷基酚标准-内标法	7.12	357674.40	7.32	0.91	7.56	1.06	7.63	598289.30	7.68	0.75	7.97	686769.80	7.98	0.79
Mn					7.11	345929.90	7.31	0.89	7.55	1.02	7.62	555449.90	7.67	0.70	7.96	603475.60	7.97	0.79
Max					7.12	367922.60	7.32	0.95	7.57	1.16	7.63	600721.30	7.68	0.75	7.97	686769.80	7.98	0.82
AVG					7.12	358997.30	7.32	0.92	7.56	1.09	7.63	588291.10	7.68	0.72	7.97	650046.50	7.98	0.81
SD					0.00	7665.50	0.00	0.02	0.01	0.05	0.00	16902.66	0.00	0.02	0.00	29773.76	0.00	0.01
▶ RSD					0.05	2.14	0.04	2.34	0.09	4.96	0.04	2.87	0.04	2.70	0.04	4.58	0.04	1.85
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

50ppb 重复性:

样品信息				双酚A-D4		双酚A		4-叔丁基苯酚-D13		4-叔丁基苯酚		4-丁基苯酚		4-戊基苯酚		4-己基苯酚		4-庚基苯酚		
↓	↑	数据文件	采集时间	定量方法	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积
1	▼	50ppb-2	2023-05-31 01:21	烷基酚标准-内标法	4.61	766519.60	4.63	4.17	5.26	186468.60	5.33	6.57	5.74	9.53	6.36	12.43	6.88	9.62	7.12	5.35
2		50ppb-3	2023-05-31 01:33	烷基酚标准-内标法	4.61	760127.40	4.63	4.28	5.26	182817.50	5.33	6.58	5.74	9.70	6.36	12.47	6.88	9.24	7.12	5.22
3		50ppb-4	2023-05-31 01:45	烷基酚标准-内标法	4.61	773271.30	4.63	4.19	5.26	187240.10	5.33	6.42	5.74	9.30	6.36	12.13	6.89	9.19	7.12	5.27
4		50ppb-5	2023-05-31 01:57	烷基酚标准-内标法	4.61	776488.30	4.63	4.20	5.26	190134.20	5.33	6.41	5.74	9.26	6.36	12.27	6.89	9.15	7.12	5.41
5		50ppb-6	2023-05-31 02:09	烷基酚标准-内标法	4.61	761509.90	4.63	4.31	5.26	188080.00	5.33	6.54	5.74	9.67	6.36	12.62	6.89	9.47	7.12	5.20
6		50ppb-7	2023-05-31 02:21	烷基酚标准-内标法	4.61	765225.10	4.63	4.27	5.27	184077.90	5.33	6.65	5.74	9.38	6.36	12.29	6.89	9.39	7.12	5.08
Mn					4.61	760127.40	4.63	4.17	5.26	182817.50	5.33	6.41	5.74	9.26	6.36	12.13	6.88	9.15	7.12	5.08
Max					4.61	776488.30	4.63	4.31	5.27	190134.20	5.33	6.65	5.74	9.70	6.36	12.62	6.89	9.62	7.12	5.41
AVG					4.61	767190.30	4.63	4.24	5.26	186469.70	5.33	6.53	5.74	9.47	6.36	12.37	6.88	9.35	7.12	5.25
SD					0.00	6479.13	0.00	0.05	0.00	2671.12	0.00	0.10	0.00	0.19	0.00	0.17	0.00	0.18	0.00	0.11
▶ RSD					0.05	0.84	0.04	1.29	0.05	1.43	0.04	1.47	0.03	2.02	0.03	1.39	0.04	1.95	0.03	2.19
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

样品信息				4-叔辛基苯酚-13C6		4-庚基苯酚		4-支链壬基苯酚		4-辛基苯酚-D17		4-辛基苯酚		4-n-壬基苯酚-D5		4-壬基苯酚		
↓	↑	数据文件	采集时间	定量方法	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积	保留时间	相对峰面积
1	▼	50ppb-2	2023-05-31 01:21	烷基酚标准-内标法	7.12	347361.00	7.32	8.46	7.56	7.66	7.63	661867.90	7.68	7.49	7.97	720985.80	7.98	8.44
2		50ppb-3	2023-05-31 01:33	烷基酚标准-内标法	7.12	352474.30	7.32	8.64	7.56	7.32	7.63	661164.80	7.68	7.43	7.97	741312.40	7.98	8.22
3		50ppb-4	2023-05-31 01:45	烷基酚标准-内标法	7.12	361347.40	7.32	8.49	7.56	7.35	7.63	656050.90	7.68	7.59	7.97	748907.80	7.98	8.28
4		50ppb-5	2023-05-31 01:57	烷基酚标准-内标法	7.11	349836.90	7.31	8.32	7.56	7.35	7.63	680537.40	7.68	7.38	7.97	773797.30	7.98	8.22
5		50ppb-6	2023-05-31 02:09	烷基酚标准-内标法	7.12	356238.40	7.32	7.90	7.57	7.15	7.63	695681.40	7.68	7.36	7.97	787647.60	7.98	7.91
6		50ppb-7	2023-05-31 02:21	烷基酚标准-内标法	7.12	355280.20	7.32	8.21	7.56	7.17	7.63	671889.80	7.68	7.58	7.97	784369.00	7.98	8.21
Mn					7.11	347361.00	7.31	7.90	7.56	7.15	7.63	656050.90	7.68	7.36	7.97	720985.80	7.98	7.91
Max					7.12	361347.40	7.32	8.64	7.57	7.66	7.63	695681.40	7.68	7.59	7.97	787647.60	7.98	8.44
AVG					7.12	353756.40	7.32	8.33	7.56	7.33	7.63	671198.70	7.68	7.47	7.97	759503.30	7.98	8.22
SD					0.00	4980.22	0.00	0.26	0.00	0.18	0.00	14861.29	0.00	0.10	0.00	26613.89	0.00	0.17
▶ RSD					0.03	1.41	0.03	3.13	0.03	2.51	0.01	2.21	0.01	1.30	0.02	3.50	0.02	2.08
IDL					0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

可知所有化合物的峰面积 RSD 和保留时间 RSD 均在 5%和 0.08%以下,精密程度较好。

3.3 回收率

在海水水样中加入最终浓度分别为 0.5、5、50ng/mL 的标准品,按照 2.3 进行前处理,实验平行进行两次,得到的回收率结果如下所示。双酚 A 以及九种烷基酚化合物的回收率均在 70-120%之间。

样品信息				双酚A				4-叔丁基苯酚				4-丁基苯酚				4-戊基苯酚				4-己基苯酚				
↓	↑	数据文件	采集时间	定量方法	保留时间	计算浓度	加标浓度	原始浓度	回收率(%)	保留时间	计算浓度	加标浓度	原始浓度	回收率(%)	保留时间	计算浓度	加标浓度	原始浓度	回收率(%)	保留时间	计算浓度	加标浓度	原始浓度	回收率(%)
1	▼	海水样本-2-1	2023-05-31 03:57	烷基酚标准-内标法	4.63	1.0887	0.50	0.533	2.0868	7.32	0.6893	0.50												

样品名称	检测日期	检测项目	4-叔丁基苯酚				4-丁基酚				4-戊基酚				4-己基酚			
			峰面积	峰高	峰宽	峰宽%	峰面积	峰高	峰宽	峰宽%	峰面积	峰高	峰宽	峰宽%	峰面积	峰高	峰宽	峰宽%
1	2023-05-31	2023-05-31 04:09	4.63	0.10	1.8985	5.33	0.20	2.0798	7.14	0.02	0.3498	6.88	0.01	0.0203	6.88	0.01	0.0203	
2	2023-05-31	2023-05-31 04:09	4.63	0.10	1.8985	5.33	0.20	2.0798	7.14	0.02	0.3498	6.88	0.01	0.0203	6.88	0.01	0.0203	
3	2023-05-31	2023-05-31 05:56	4.63	0.10	1.8985	5.33	0.20	2.0798	7.14	0.02	0.3498	6.88	0.01	0.0203	6.88	0.01	0.0203	
4	2023-05-31	2023-05-31 06:08	4.63	0.10	1.8985	5.33	0.20	2.0798	7.14	0.02	0.3498	6.88	0.01	0.0203	6.88	0.01	0.0203	

4 结论

本文考察了海水中双酚 A、4-叔丁基苯酚、4-丁基酚、4-戊基酚、4-己基酚、4-庚基酚、4-叔辛基酚、4-辛基酚、4-支链壬基酚、4-壬基酚 10 种内分泌干扰物测定的线性、精密度、回收率、灵敏度等指标。结果表明：10 种内分泌干扰物在检测范围内线性良好，相关系数 r 均大于 0.9989，方法精密度在 5%以内，回收率在 70-120%以内，灵敏度符合标准要求。使用高灵敏、高抗污染能力的 EXPEC 5210 系统，可以对海水中双酚 A、4-叔丁基苯酚、4-丁基酚、4-戊基酚、4-己基酚、4-庚基酚、4-叔辛基酚、4-辛基酚、4-支链壬基酚、4-壬基酚进行灵敏、准确的定量检测。

● 附录 设备与耗材方案

一、EXPEC 5210 配置详情

配件类型	货号	名称	规格
配置			
毛细管	P00490-0502	离子源毛细管(APCI)	
色谱柱	P01177-007	CNW shell C18 核壳色谱柱	2.6um, 2.1*100mm
耗材			
液相自动进样器进样针	P01177-0108	15uL 进样针	
液相泵单向阀	P01177-0103	液相泵单向阀阀芯	
液相泵密封圈	P01177-0104	柱塞泵密封圈	
进样瓶	P01177-0133	2mL 透明样品瓶	100 只/盒
进样瓶盖	P01177-0134	2mL 样品瓶盖及垫片	100 只/盒

二、标准品

产品类型	货号	名称	规格
标准品	CDAAM-390018-JD-1.2ml	9种烷基酚类和双酚A混标	1000mg/L于乙腈, 1.2ml