

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

廖涛¹ 吴晓翠^{1,2} 王少华¹ 谢松光³ 熊光权¹
耿胜荣¹ 李新¹ 钜晓艳¹ 胡筱波^{* 2}

¹(湖北农业科技创新中心,湖北省农业科学院农产品加工与

核农技术研究所/湖北省农产品辐照工程技术中心,武汉 430064)

²(华中农业大学食品科学技术学院,武汉 430070) ³(中国科学院水生生物研究所,武汉 430072)

摘 要 建立了固相萃取-气质联用法(SPE-GC-MS)测定水体中 9 种环境雌激素:雌酮(E₁)、17 β -雌二醇(E₂)、雌三醇(E₃)、4-辛基酚(OP)、4-壬基酚(NP)、双酚 A(BPA)、己烯雌酚(DES)、美雌醇(E₂ME)和 17 α -炔雌醇(E₂)的检测方法,优化了萃取和衍生化反应条件,实验结果表明:HLB 柱回收率较高,衍生化反应的温度为 75 $^{\circ}\text{C}$,衍生时间为 90 min;本方法对 9 种环境雌激素的加标回收率为 60.5% ~ 126.7%,对应的相对标准偏差为 0.8% ~ 11.1%,方法检出限为 1.08 ~ 8.60 ng/L,并将本方法应用于实际环境水样的检测。

关键词 环境雌激素;固相萃取;气相色谱/质谱联用法

1 引言

环境雌激素种类繁多,分布广泛,会通过食物链在动物和人体内富集。极低浓度的环境雌激素就能对动物和人生殖系统、神经系统和免疫系统造成严重损害^[1]。环境雌激素对水生生物的影响表现为诱导水生生物性别的改变,是雄鱼产生卵黄蛋白原(Vtg)的主要诱发剂^[2,3]。环境雌激素对人的影响主要有:男性突出表现为性腺发育不良,生殖道肿瘤和先天畸形等,女性则是乳腺癌的发生率增加;对神经系统的损害表现为智能低下,神经行为异常等。此外,环境雌激素还可能影响免疫系统打破机体平衡,危害人体健康^[4]。

目前,环境雌激素的检测方法主要有免疫法^[5](放射免疫和酶联免疫),液相色谱法^[6~9](HPLC、HPLC-MS 和 HPLC-MS-MS),气相色谱法(GC、GC-MS 和 GC-MS-MS)^[10~12]。免疫法往往只针对单一化合物进行分析,难以满足多残留分析的发展趋势;而液相色谱-质谱联用则需要购买昂贵的仪器设备,使得该方法难以推广普及。有关部分水体(包括泥沙基质)中的雌激素的测定已有报道^[13~15],Quintana 用 GC-MS-MS 分析过废水中的 6 种天然雌激素和合成雌激素,定量检出限在 1 ~ 3 ng/L 之间^[10]。Lei 等测得天津某 3 条河流域中的 6 种环境雌激素含量为 0.64 ~ 174 ng/L^[13]。但这些文献往往局限于几种或一类雌激素化合物的检测分析,同时测定水体中这 9 种雌激素化合物的方法还未见报道。

本研究利用固相萃取-气相色谱/质谱联用法,建立了有效的雌激素多残留的检测方法,并对水中的 9 种环境雌激素(辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、雌二醇、雌三醇、美雌醇和炔雌醇)进行同时检测分析。

2 实验部分

2.1 材料与试剂

乙酸乙酯(HPLC 级, Fisher 公司); HCl(分析纯, 开封东大化工有限公司); 辛基酚(4-Octylphenol, 99.9%, Supelco 公司); 壬基酚(4-Nonylphenol, 99.9%)、双酚 A(Bisphenol A, 97%)、己烯雌酚(Diethylstilbestrol, 99.3%)、雌酮(Estrone, 99.9%)、雌三醇(Estriol, 99.3%)、美雌醇(Mestranol, 99.2%)和炔雌醇(17-Ethinyl estradiol, 99.3%), 均购自 Fluka 公司; 雌二醇(17-E-estradiol, 97%, Aldrich 公司); 17-E₂-d₄

2012-06-01 收稿; 2012-09-23 接受

本文系湖北省国际合作项目(No.2010BFA019), 湖北省自然科学基金项目(No.2009CDB265)和湖北省农科院青年科学基金项目(No.2012NKYJJ17)资助

* E-mail: hxbxmg@mail.hzau.edu.cn

(17-Estradiol, 95% ~ 97%), BPA- d_{16} (Bisphenol A, 98%), Cambridge Isotope Laboratories 公司; N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA, Aldrich 公司), 实验用水均为二次蒸馏水。将9种标准物质分别用乙酸乙酯配成单独的标准贮备液, 然后配制成 10 ng/L 的混合标准中间溶液, 置于 -20 °C 保存。用时再稀释成混合标准工作溶液。

2.2 仪器及条件

7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪(安捷伦公司), 98-1 磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司), 便携式雷磁 PHB-4pH 计(上海精密科学仪器有限公司), HSC-24A 氮吹仪(南京科捷分析仪器有限公司), SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

GC 条件: 氦气为载气, 流速 1 mL/min, 进样口温度 250 °C; 升温程序: 初始温度为 100 °C, 保持 1 min; 以 20 °C/min 升至 200 °C, 保持 5 min; 以 3 °C/min 升至 280 °C, 保持 2 min。不分流方式进样, 进样体积 1.0 μ L。HP-5MS 色谱柱(30 m $\times$ 250 μ m, 0.25 μ m)。

MS 条件: 接口温度 280 °C, 离子源温度 230 °C, 四级杆温度 150 °C; EI 源, 电子轰击能量 70 eV; 溶剂延迟时间 3 min, 全扫描范围 m/z 50 ~ 550, 选择离子监测模式进行定量分析。

2.3 样品前处理

2.3.1 固相萃取 水样用棕色瓶装, 经 0.45 μ m 滤膜去除杂物, 再用 HCl 调至 pH 3, 于 -20 °C 避光保存。Oasis HLB 柱子用 5 mL 乙酸乙酯预处理, 再用 5 mL 甲醇浸泡 5 min; 以 15 mL HCl (pH = 3) 过柱; 将 500 mL 水样(固定内标 BPA- d_{16} 和 E_2 - d_4 的含量均为 35 ng/L) 以 1 mL/min 的速度萃取, 用 10 mL 甲醇-水(1 : 9, V/V) 洗柱, 真空干燥 40 min 后, 用 10 mL 乙酸乙酯洗脱。

2.3.2 衍生化 洗脱液在 45 °C 氮吹浓缩至近干, 转移至色谱小瓶, 氮吹浓缩至干, 残余物加入 50 μ L MSTFA, 于 75 °C 反应 90 min, 冷却至室温后, 进行 GC-MS 分析。

2.3.3 GC-MS 分析 以衍生物特征离子和保留时间定性, 峰面积定量, 对样品进行检测分析。图 1 为目标化合物的选择离子监测(SIM) 色谱图。

3 结果与讨论

3.1 萃取流速的比较

分别用 1, 2 和 5 mL/min 的速度萃取水样。图 2 表明, 当流速超过 1 mL/min 时, 部分物质回收率明显降低, 因而水样流速控制在 1 mL/min 以内 ($n=5$)。

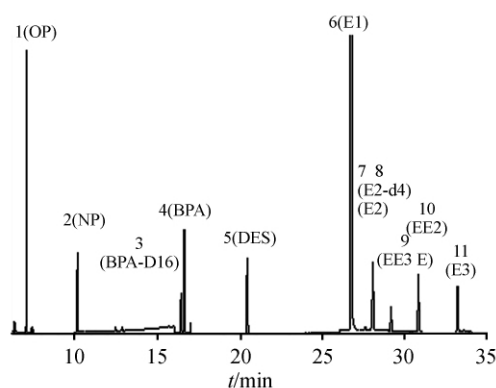


图1 目标化合物的选择离子监测色谱图

Fig 1 GC-MS-SIM chromatogram of target compounds
1. 辛基酚 (4-Octylphenol, OP); 2. 壬基酚 (4-Nonylphenol, NP); 3. 双酚 d16 (Bisphenol d16, BP d16); 4. 双酚 A (Bisphenol A, BPA); 5. 己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, DES); 6. 雌酮 (Estrone, E1); 7,8. 雌二醇 (Estradiol, E2, E2-d4); 9. 美雌醇 (Mestranol, EE3ME); 10. 炔雌醇 (Ethinyl estradiol, EE2); 11. 雌三醇 (Estril, E3)。

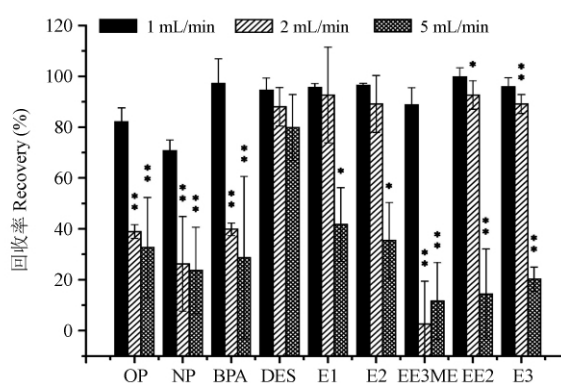


图2 流速分别为 1, 2 和 5 mL/min 时 9 种雌激素的回收率 ($n=5$)

Fig 2 Recovery rate of nine kinds of estrogens when flow rate was 1, 2 and 5 mL/min ($n=5$)

* 表示在 95% 置信区间内显著; ** 表示在 99% 置信区间内显著。

* : Significant different at the 95% confidence interval;
* * : significant different at the 99% confidence interval.

3.2 衍生化条件的选择

衍生化的时间和温度会影响衍生化的效果。在 75 °C 下,分别将衍生化时间定为 10,30,60 和 90 min。结果表明(见图 3),衍生 90 min 时效果较好。将衍生时间固定为 90 min,分别将温度设为 65, 75, 85 和 95 °C。结果表明(见图 4),当温度为 75 °C,时间 90 min 时衍生化效果较好。

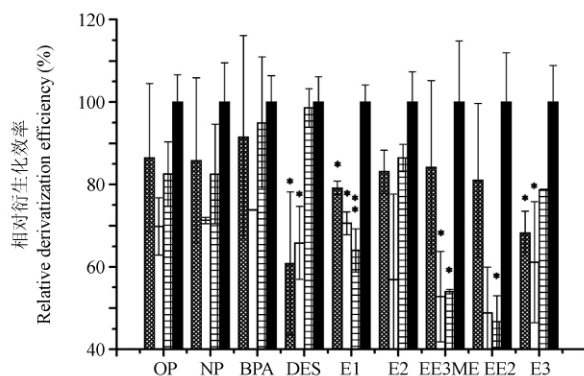


图 3 75 °C 下 9 种雌激素在不同衍生化时间下的相对衍生化效率(n=5)

Fig 3 Relative derivatization efficiency of 9 estrogens during different time of derivatization at 75 °C (n=5)

▨ 10 min; □ 30 min; ▤ 60 min; ■ 90 min.

* 表示在 95%置信区间内显著; ** 表示在 99%置信区间内显著。

* : significant different at the 95% confidence interval;

** : significant different at the 99% confidence interval.

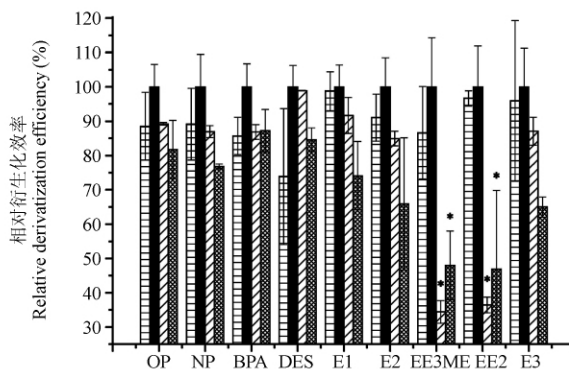


图 4 9 种雌激素在不同衍生化温度下衍生化 90 min 的相对衍生化效率(n=5)

Fig 4 Relative derivatization efficiency of 9 estrogens at different derivative temperature during 90 min (n=5)

▨ 10 min; □ 30 min; ▤ 60 min; ■ 90 min.

* 表示在 95%置信区间内显著; ** 表示在 99%置信区间内显著。

* : significant different at the 95% confidence interval;

** : significant different at the 99% confidence interval.

3.3 线性范围与检出限

将混合标准工作中间溶液分别配成 0.01 ~ 16 mg/L 混合标准溶液,经处理后进样,以信噪比 S/N = 3 所对应的被测化合物浓度作为方法的检出限(MDL),9 种目标化合物的检出限和相对标准偏差(RSD)见表 1。

表 1 目标化合物的线性范围、检出限(S/N = 3)和相对标准偏差

Table 1 Linear range, limit of detection and relative standard derivation of target compounds

化合物 Compounds	特征离子 Characteristic ions (m/z)	线性范围 Linear range (ng/L)	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Limit of detection (ng/L)	RSD (%, n=5)
OP	207*, 208	5 ~ 1000	0.9984	1.2	9.6
NP	179*, 221, 292	5 ~ 1000	0.9998	2.4	8.6
BPA	357*, 358, 372	5 ~ 1000	0.9978	1.1	8.3
DES	383, 397, 412*	5 ~ 1600	0.9977	1.4	8.7
E1	218, 257, 342*	5 ~ 1600	0.9995	1.6	5.1
E2	129, 285*, 416	5 ~ 1000	0.9991	2.1	1.7
EE3ME	367*, 368, 382	10 ~ 1600	0.9997	8.6	6.4
EE2	232, 285, 425*	10 ~ 1600	0.9990	6.1	8.6
E3	129, 345, 504*	5 ~ 1000	0.9974	2.9	7.4

* : 定量离子(Quantitative ion)。

3.4 回收率与精密度实验

比较了 Oasis HLB 柱和 Strata 柱的萃取效果,结果用回收率来表示。如表 2 所示,在相同的条件下,Oasis HLB 柱子的萃取效果相对较好。

按实验方法,将不同浓度混合标准溶液经衍生化后进行 GC-MS 测定,连续测定 8 次,RSD 为 2% ~ 16%,说明此方法精密度良好。

3.5 水体中环境雌激素的检测

利用本方法初步分析了荆州市四湖总干渠受环境雌激素污染水平不同的 3 个断面(A 段为源头,

污染较轻; B段位于中游某工业排污口下方; C段位于河流下游某城镇出口处)的9种环境雌激素浓度(表3)。结果表明, A段水体污染较轻, B段水体NP浓度为 (54.00 ± 5.91) ng/L, C段水体NP的浓度高达 (338.50 ± 43.94) ng/L, EI和E3的含量分别为 (17.00 ± 1.87) ng/L和 (38.00 ± 3.42) ng/L。说明C段水体存在一定程度的环境雌激素污染。实验结果表明, 本方法适用于水中环境雌激素多残留检测。

表2 目标物质的回收率($n=5$)Table 2 Recovery of target compounds ($n=5$)

回收率 Recoveries (%)					回收率 Recoveries (%)				
化合物 Compounds	Oasis HLB 柱 Oasis HLB cartridges		Strata 柱 Strata cartridges		化合物 Compounds	Oasis HLB 柱 Oasis HLB cartridges		Strata 柱 Strata cartridges	
	800 ng/L	100 ng/L	800 ng/L	100 ng/L		800 ng/L	100 ng/L	800 ng/L	100 ng/L
OP	80.2 ± 3.3	82.1 ± 5.4	26.5 ± 13.8	5.7 ± 6.1	E2	93.9 ± 9.0	96.3 ± 0.8	25.0 ± 1.7	83 ± 41
NP	60.5 ± 6.3	70.8 ± 4.2	18.3 ± 4.5	17.6 ± 7.7	EE3ME	103.7 ± 8.4	88.8 ± 6.6	113 ± 10	33 ± 49
BPA	89.1 ± 3.2	97.2 ± 9.8	103 ± 1.5	49 ± 70	EE2	126.7 ± 11.1	99.7 ± 3.5	66 ± 11	44 ± 35
DES	77.0 ± 0.9	94.5 ± 4.8	88.0 ± 3.4	89.6 ± 18.3	E3	76.2 ± 9.7	95.8 ± 3.5	23 ± 3	56 ± 48
EI	84.4 ± 3.8	95.6 ± 12.0	22.0 ± 1.7	62.2 ± 43					

表3 目标化合物在河水中的浓度

Table 3 Concentrations of target compounds in rivers

各河段水样中 9 种环境雌激素的浓度				各河段水样中 9 种环境雌激素的浓度			
化合物 Compounds	(ng/L,n=4)			化合物 Compounds	Concentrations of nine kinds of estrogens (ng/L,n=4)		
	A	B	C		A	B	C
OP	ND	1.50 ±0.12	3.00 ±0.34	E2	ND	ND	ND
NP	2.95 ±0.39	54.0 ±5.9	338 ±44	EE3ME	ND	ND	ND
PA	43.0 ±1.8	ND	95.0 ±16.2	EE2	ND	ND	ND
DES	ND	ND	ND	E3	ND	ND	38.0 ±3.4
EI	ND	ND	17.0 ±1.9				

ND: 未检出 Not detected.

References

- Lange I G, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D, Meyer H H D. Anal. Chim. Acta, 2002, 473(1-2): 27 - 37
- Wanier S R, Tirumalai R, Subramoniam T. Comp. Biochem. Physiol. A, 2001, 130: 283 - 294
- Fields S M, Ye C Q, Zhang D D, Branch B R, Zhang X J, Okafo N. J. Chromatogr. A, 2001, 913(1-2): 197 - 204
- YAN Wei, LIN Jin-Ming. Chinese J. Anal. Chem., 2010, 38(4): 598 - 606
严伟, 林金明. 分析化学, 2010, 38(4): 598 - 606
- Hintemann T, Schneider C, Schöler H F, Schneider R J. Water Res., 2006, 40(12): 2287 - 2294
- LI Yu, LIU Jian-Lin, ZHANG Chen, WANG Xia-Jiao. Chinese J. Anal. Chem., 2012, 40(1): 107 - 112
李鱼, 刘建林, 张琛, 王夏娇. 分析化学, 2012, 40(1): 107 - 112
- WANG He-Xing, ZHOU Ying, JIANG Qing-Wu. Chinese J. Anal. Chem., 2011, 39(9): 1323 - 1328
王和兴, 周颖, 姜庆五. 分析化学, 2011, 39(9): 1323 - 1328
- LIU Jian-Lin, ZHANG Chen, WANG Xia-Jiao, WANG Ting, LI Yu. Chem. J. Chinese Universities, 2012, 33(1): 37 - 43
刘建林, 张琛, 王夏娇, 王婷, 李鱼. 高等学校化学学报, 2012, 33(1): 37 - 43
- XUE Min, WANG An, WANG Yu, WANG Dan, LÜ Zhi, MENG Zi-Hui, ZHANG Wei-Bing. Chinese J. Anal. Chem., 2011, 39(6): 793 - 798
薛敏, 王安, 王瑜, 王丹, 吕稚, 孟子晖, 张维冰. 分析化学, 2011, 39(6): 793 - 798
- Quintana J B, Carpinteiro J, Rodríguez I, Lorenzo R A, Carro A M, Cela R. J. Chromatogr. A, 2004, 1024(1-2): 177 - 185
- Gabet V, Miège C, Bados P, Coquery M. TrAC, Trends Anal. Chem., 2007, 26(11): 1113 - 1131
- Nie Y F, Qiang Z M, Zhang H Q, Adams C. J. Chromatogr. A, 2009, 1216(42): 7071 - 7080
- Lei B L, Huang S B, Zhou Y Q, Wang D H, Wang Z J. Chemosphere, 2009, 76(1): 36 - 42
- Duong C N, Ra J S, Cho J, Kim S D, Choi H K, Park J H, Kim K W, Inam E, Kim S D. Chemosphere, 2010, 78(3): 286

