

固相萃取-衍生化气相色谱/质谱法测定 制药厂污水中的环境雌激素

黄 成, 姜理英, 陈建孟, 陈 效

(浙江工业大学生物与环境工程学院, 浙江 杭州 310014)

摘要 :采用固相萃取-衍生化气相色谱/质谱法(GC/MS)测定某制药厂污水中的雌酮(E1)、雌二醇(E2)、雌三醇(E3)和乙炔基雌二醇(EE2) 4 种雌激素化合物。样品经固相萃取柱萃取富集及双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(1% 三甲基氯硅烷 X BSTFA(1% TMCS))衍生化后进行 GC/MS 分析。该法对 4 种目标物的检出限为 1.8 ~ 4.7 ng/L , 相对标准偏差为 2.3% ~ 9.1%($n = 8$)。目标化化合物的加标回收率为(94.0 ± 2.9)% ~ (101 ± 3.8)% , 说明该方法能较好地应用于污水中雌激素化合物的定量检测。通过对某制药厂污水中的雌激素进行定量分析 , 发现污水中乙炔基雌二醇和雌酮质量浓度分别达 396.6 和 39.9 ng/L , 经过传统的厌氧—兼氧—好氧生物处理后 , 污水中的环境雌激素的去除率仅为 35% ~ 40% , 说明传统的污水处理工艺对去除污水中雌激素效果并不明显 , 需要改进。

关键词 :固相萃取 ; 衍生化 ; 气相色谱/质谱法 ; 环境雌激素 ; 污水

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2008)05-0618-04 栏目类别 :研究论文

Determination of environmental estrogens in pharmacy wastewater using solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry with derivatization

HUANG Cheng , JIANG Liying , CHEN Jianmeng , CHEN Xiao

(Department of Biological and Environmental Engineering , Zhejiang University
of Technology , Hangzhou 310014 , China)

Abstract : A method for the determination of estrone (E1) , estradiol (E2) , ethinylestradiol (EE2) and estriol (E3) in pharmacy wastewater was developed using solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPE-GC/MS) with derivatization. The sample was extracted by an SPE column , derivatized by bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) , and analyzed by GC/MS. The detection limits were 1.8 – 4.7 ng/L , and the relative standard deviations were 2.3% – 9.1%($n = 8$). The recoveries of above four environmental estrogen compounds were (94.0 ± 2.9)% to (101 ± 3.8)%. The method can be applied in the determination of the estrogenic compounds in wastewater samples successfully. The concentrations of EE2 and E1 in wastewater were 396.6 ng/L and 39.9 ng/L , respectively , and the removal rates of EE2 and E1 were 35% – 40% after traditional biological treatment. The results demonstrated that the removal efficiency was not satisfactory and the traditional treatment process of wastewater containing estrogen compounds from pharmaceuticals factory should be improved.

Key words : solid-phase extraction ; derivatization ; gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) ; environmental estrogens ; wastewater

环境雌激素(environmental estrogens)又称为内分泌干扰物 , 其进入动物或人体后能对机体内正常内分泌物质的合成、释放、运转、代谢以及结合等

产生干扰 , 从而破坏内分泌系统的调控作用 , 最后引起生物体的生殖、免疫、神经等系统的多种病变^[1,2]。国外已经对一些水体中的雌激素进行了调

查分析^[3-5],我国目前在这方面的测定数据有限,因而开展对水环境中环境激素,特别是雌激素的调查研究,对考察和保护我国的水环境非常重要。

目前国际上没有建立系统的分析环境中的雌激素物质的标准方法。文献报道的分析环境雌激素的方法多为气相色谱/质谱法(GC/MS)和高效液相色谱/质谱法^[6-16]。低浓度的雌激素一般用 GC/MS 分析。为了降低分析物的极性,提高分离柱效和检测灵敏度,一般需要将目标物衍生化后再进行 GC/MS 分析。

浙江省仙居县某制药厂主要生产黄体酮、螺内酯、安宫黄体酮、醋酸甲地孕酮、蔡丁美酮等原料药及中间体。这些物质含有较多的雌激素成分,特别是乙炔基雌二醇(EE2)。本文采用固相萃取-衍生化气相色谱/质谱法测定污水中的环境雌激素(主要为雌酮(E1)、雌二醇(E2)、雌三醇(E3)和EE2),并结合该厂的污水处理工艺,研究雌激素在污水各处理单元的变化规律,考察了传统的污水处理工艺对该物质的处理效果,为环境中雌激素的检测和去除提供了检测手段和技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 公司的 HP6890-5975N GC/MS 仪及 HP-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 μm×0.25 mm), Oasis HLB 固相萃取柱(200 mg,6 mL),HSE-12D 固相萃取装置(天津市恒奥科技发展有限公司)。

E1(纯度>99%)、E2(纯度>99%)、E3(纯度>99%)、EE2(纯度>98%)标准品均购自 Sigma 公司。上述标准品均用甲醇配成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液,混合标准溶液中 4 种物质的质量浓度均为 10 mg/L,根据需要用甲醇将储备液稀释至所需浓度,于-20℃下保存。内标物为雌二醇同位素(E2-D₄)。衍生化试剂为双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(1%三甲基氯硅烷)(BSTFA(1% TMCS))。甲醇(HPLC 纯,天津市四友精细化学品有限公司)、乙酸乙酯(HPLC 纯,上海化学试剂研究所)、吡啶(分析纯,无锡海硕生物有限公司)。

1.2 水样采集

采集浙江省仙居县某制药厂污水处理站各处理单元的进出口水样。用棕色瓶采集样品,经 0.45 μm 滤膜过滤去除颗粒物,用 4 mol/L 盐酸将 pH 值调至 2~3,以避免微生物降解。在进行固相萃取之前将样品于 4℃下避光保存,所有样品需在 48 h 内进行处理分析。

1.3 固相萃取

用 5 mL 乙酸乙酯预处理 SPE 柱以清除柱上的杂质,然后在低真空条件下用 5 mL 甲醇浸泡 5 min,之后用 15 mL 超纯水以 1~2 mL/min 流速过柱以活化萃取柱。将 1 000 mL 水样以 5 mL/min 的速度过柱,用 10 mL 水-甲醇(体积比为 9:1)淋洗,没有液体流出后抽气 5 min 并真空干燥 30 min,以尽量除去残留的水分。最后用 10 mL 乙酸乙酯以 1 mL/min 流速将分析物洗脱至 20 mL 小瓶中,在 45℃下用氮气流缓慢浓缩至 1 mL。

1.4 衍生化

根据实际的实验情况,对文献[10]的衍生化反应条件进行了优化。优化后的衍生化方法为:将各浓度标样或经固相萃取所得的浓缩液转入 2 mL 小瓶,加入 100 ng E2-D₄ 内标物质,用氮气流缓慢蒸发至干,残余物中加入 50 μL 吡啶和 100 μL BSTFA(1% TMCS),于 70℃下反应 30 min,冷却至室温后取样进行 GC/MS 分析。

1.5 GC/MS 分析

GC 条件:以氦气为载气,恒流流速为 1.0 mL/min,进样口温度为 250℃,柱温升温程序:初始温度为 100℃,保持 1 min,然后以 10℃/min 升至 200℃,再以 3℃/min 升至 300℃并保持 10 min。不分流方式进样,进样体积为 2.0 μL。

MS 条件:电子轰击电离源(EI),电子轰击能量为 70 eV,离子源温度为 230℃,接口温度为 280℃;溶剂延迟时间为 15 min;采用全扫描模式和选择离子监测模式扫描,扫描范围为 *m/z* 50~600。根据 4 种物质的标准谱图,对每种物质选择几个丰度较强的离子作为定量和定性离子。各目标物的定量离子和特征离子见表 1。图 1 为目标化合物的全扫描

表 1 目标化合物衍生物的保留时间及定性离子

Table 1 Retention times and quantitative ions and qualitative ions of target compound derivatives			
Compound	Retention time/min	Quantitative ion (<i>m/z</i>)	Qualitative ions (<i>m/z</i>)
E1	25.680	342 [M] ⁺	218 [M-C ₈ H ₁₂ O] ⁺
E2	26.891	416 [M] ⁺	285 [M-CH ₃ -C ₅ H ₁₂ SiO] ⁺ ; 232 [M-CH ₃ -C ₅ H ₁₂ SiO-C ₄ H ₅] ⁺
EE2	29.416	425 [M-CH ₃] ⁺	285 [M-CH ₃ -C ₇ H ₁₂ SiO] ⁺ ; 232 [M-CH ₃ -C ₇ H ₁₂ SiO-C ₄ H ₅] ⁺
E3	31.674	504 [M] ⁺	311 [M-CH ₃ -C ₆ H ₁₈ Si ₂ O ₂] ⁺
E2-D ₄	26.850	420 [M] ⁺	289 [M-CH ₃ -C ₅ H ₁₂ SiO] ⁺

模式的色谱图和选择离子监测模式下的色谱图。以全扫描模式得到的衍生物特征离子和保留时间定性,以选择离子扫描模式得到的峰面积定量。

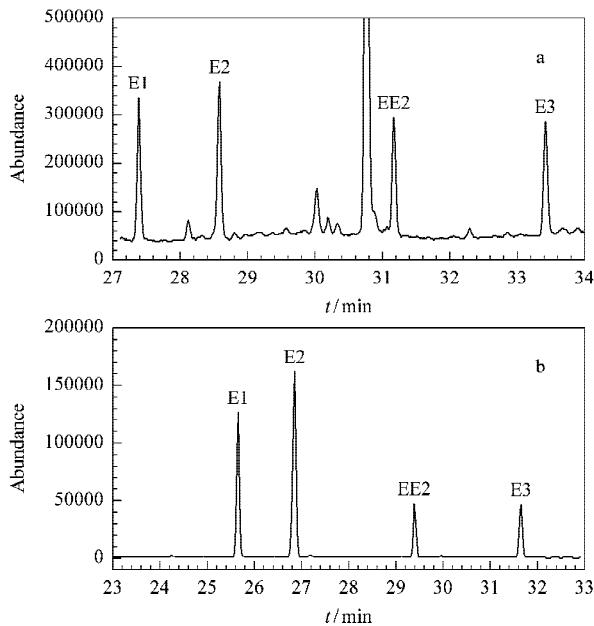


图 1 目标化合物的(a)全扫描和(b)选择离子监测色谱图
Fig. 1 Chromatograms of target compounds by (a) full scan and (b) selected ion monitoring

2 结果与讨论

2.1 线性关系

在经过三级 SPE 柱净化的污水中加标测定 GC/MS 的线性范围。加标后使污水中目标化合物的质量浓度分别为 10 20 50 100 500 1 000 ng/L ,加入 100 ng 内标物 ,按所建立的分析方法测定。以目标物的分子离子峰与内标物的分子离子峰的峰面积的比值 Y 为纵坐标 ,以目标物的质量浓度 X (ng/L)为横坐标 ,得到的线性回归方程见表 2。从表 2 结果可知 4 种雌激素在 10 ~ 1 000 ng/L 范围内均有较好的线性关系。

表 2 目标化合物的线性范围和线性方程

Compound	Linear range/ (ng/L)	Linear equation *	r^2
E1	10 - 1000	$Y = 2.4216X - 0.2647$	0.9997
E2	10 - 1000	$Y = 1.2631X + 0.0203$	0.9998
EE2	10 - 1000	$Y = 1.2500X - 0.1852$	0.9994
E3	10 - 1000	$Y = 1.1874X - 0.1765$	0.9990

* Y : peak area ratio of analyte and internal standard ; X : mass concentration of analyte , ng/L.

2.2 检出限和定量限

按信噪比(S/N)为 3 计方法的检出限(LOD) ,以 $S/N = 10$ 计定量限(LOQ) ,结果见表 3。由此可知 ,此方法的 LOD 值为 1.8 ~ 4.7 ng/L ,LOQ 值为

6.0 ~ 15.7 ng/L ,这说明该方法能对水体中痕量的环境雌激素进行定量和定性。

表 3 目标化合物的检出限和定量限

Table 3 Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for target compounds		
Compound	LOD/(ng/L)	LOQ/(ng/L)
E1	1.8	6.0
E2	2.2	7.3
EE2	2.5	8.4
E3	4.7	15.7

2.3 回收率与精密度

在不含有目标化合物的污水中加入已知量的目标化合物进行回收率测定。在空白污水样品中添加 100 300 和 500 ng/L 3 个浓度水平的目标物 ,测定回收率 ,结果见表 4。从表 4 可知 ,在各加标浓度时 ,目标物质的回收率均能保持较高的水平。

表 4 目标化合物的加标回收率($n = 3$)

Table 4 Spiked recoveries of target compounds in blank wastewater ($n = 3$)		
Compound	Spiked/(ng/L)	Recovery $\pm$ SD * /%
E1	100	101 $\pm$ 3.8
	300	99.8 $\pm$ 5.3
	500	96.3 $\pm$ 2.6
E2	100	98.2 $\pm$ 3.1
	300	96.8 $\pm$ 3.9
	500	95.1 $\pm$ 4.2
EE2	100	100 $\pm$ 3.5
	300	97.2 $\pm$ 3.0
	500	94.0 $\pm$ 2.9
E3	100	99.1 $\pm$ 2.7
	300	98.3 $\pm$ 4.1
	500	95.6 $\pm$ 3.9

* SD : standard deviation.

按照实验方法 ,对 4 种目标物的混合标准溶液进行多次样品处理 ,分析其浓度并计算相对标准偏差(RSD) ,考察方法的精密度。结果显示 RSD 为 2.3% ~ 9.1%($n = 8$) ,均小于 10% ,表明所建立的方法具有较好的精密度。

2.4 制药厂污水中环境雌激素的检测

用本实验所建立的方法测定了浙江省仙居某制药厂的污水处理站的各处理单元的水样中雌激素物质的含量 ,测定结果见表 5。

表 5 污水处理站各处理单元的水样中目标化合物的浓度($n = 3$)
Table 5 Concentrations of target compounds in wastewater from the wastewater treatment units ($n = 3$) ng/L

Compound	Infall	Regulating pool	Biotreatment pool	Outfall
E1	39.9 $\pm$ 0.92	35.6 $\pm$ 0.87	29.9 $\pm$ 0.65	25.7 $\pm$ 0.72
E2	-	-	-	-
EE2	396.6 $\pm$ 12.3	348.1 $\pm$ 11.8	278.5 $\pm$ 5.8	236.5 $\pm$ 10.1
E3	-	-	-	-

- : The concentrations were lower than LOD.

从表5可见,此制药厂污水的主要雌激素污染物为E1和EE2。进水中EE2的质量浓度高达396.6 ng/L,E1的质量浓度为39.9 ng/L。经过调节池的预处理,污水中EE2和E1的质量浓度分别降至348.1 ng/L和35.6 ng/L,去除率约为10%~12%。经过厌氧—兼氧—好氧生物处理后,去除率约为25%~30%。最终的出水中E2和EE2的质量浓度为236.5 ng/L和25.7 ng/L,总的去除率为35%~40%。由此可见传统的处理工艺对污水中雌激素的去除效果并不十分明显。

环境雌激素的存在已经成为一个关注的焦点,有关雌激素在环境中存在的浓度问题,目前国内外都有相关报道^[3-5,11,12]。在几个国家的污水处理厂进水中E1和E2的含量均较高,有的高于100 ng/L;EE2和E3的含量相对较低;本实验测定的是制药厂污水中雌激素的含量,由于该制药厂是国内口服避孕药的重要生产基地,而EE2是口服避孕药中一种非常重要的成分,其特殊性导致该制药厂的污水中检测到的EE2的浓度较高。而E1、E2、E3都是天然雌激素,它们主要是通过人类和动物自身合成分泌的,主要以人类和动物的排泄物的方式进入环境;由于该污水处理厂的污水主要是来自制药厂的各个生产环节,没有涉及生活用水,所以E2和E3没有检测到或低于检测限;至于E1,通过查阅一些相关文献,初步认为可能是EE2或该制药厂生产的一些其他物质转化而来的,但是明确的原因还不是很清楚,有待进一步研究。

3 结语

本文采用固相萃取-衍生化气相色谱/质谱法对污水中的雌激素化合物进行了定量测定。样品中的雌激素物质经SPE柱浓缩富集、BSTFA(1% TMCS)衍生化后进行GC/MS分析测定。实验结果表明该方法可以同时测定多种雌激素,且具有较好的准确度和精密度,适合水样中雌激素物质的测定。

此外,通过对某制药厂污水中雌激素化合物的定量分析测定,可知此污水中的主要雌激素物质为乙炔基雌二醇和雌酮,其质量浓度分别为396.6 ng/L和39.9 ng/L;经传统的厌氧—兼氧—好氧生物处理,污水中雌激素物质的去除率仅有35%~40%,这说明传统的污水处理工艺对去除污水中雌激素效果并不明显,应当改进。

参考文献:

- [1] Zhou S Q, Lin Y Q. Environmental Pollution and Control (周少奇,林云琴. 环境污染与防治), 2004, 26(1): 25
- [2] Dai X Y, Xu S Q, Chen X L, et al. Sichuan Environment (戴璇颖,徐世清,陈息林,等. 四川环境), 2003, 22(6): 13
- [3] Yin G G, Kookana R S, Ru Y. Environ Int, 2002, 28: 545
- [4] Belfroid A C, Van der Horst A, Vethaak A D, et al. Sci Total Environ, 1999, 225: 101
- [5] de Mes T, Zeeman G, Lettinga G. Rev Environ Sci Biotechnol, 2005, 4: 275
- [6] Wei H B, Lin J M. Life Science Instrument (魏慧斌,林金明. 生命科学仪器), 2005, 3(5): 3
- [7] Liu R, Zhou J L, Wilding A. J Chromatogr A, 2004, 1022: 179
- [8] Zhang Z L, Hibberd A, Zhou J L. Anal Chim Acta, 2006, 577: 52
- [9] Hernando M D, Mezcua M, Gómez M J, et al. J Chromatogr A, 2004, 1047: 129
- [10] Jin S W, Xu Y, Hui Y, et al. China Water & Wastewater (金士威,徐盈,惠阳,等. 中国给水排水), 2005, 21(12): 94
- [11] Zhang H, Mao J, Sun C J, et al. Chinese Journal of Chromatography (张宏,毛炯,孙成均,等. 色谱), 2003, 21(3): 451
- [12] Wang L, Liu H H, Li L S. Practical Preventive Medicine (汪莉,刘红河,李丽莎. 实用预防医学), 2004, 11(2): 360
- [13] Lee H B, Peart T E, Svoboda M L. J Chromatogr A, 2005, 1094: 122
- [14] Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P. J Chromatogr A, 2006, 1137: 207
- [15] Beck I C, Bruhn R, Gandrass J, et al. J Chromatogr A, 2005, 1090: 98
- [16] Xiao X H, Yin Y, Hu Y L, et al. Chinese Journal of Chromatography (肖小华,尹怡,胡玉玲,等. 色谱), 2007, 25(2): 234