

DOI: 10. 3724/SP. J. 1096. 2010. 01345

气相色谱/质谱法检测 小鼠肌肉组织和血液中羟基多氯联苯

史永富¹ 林洪¹ 黄冬梅² 龚倩¹ 蔡友琼^{* 2} 王媛² 钱蓓蕾²

¹(中国海洋大学 食品科学与工程学院, 青岛 266003)

²(中国水产科学研究院东海水产研究所 农业部水产品质量监督检验测试中心, 上海 200090)

摘 要 建立了测定小鼠肌肉和血液中 3 种羟基多氯联苯的气相色谱/质谱联用(GC-MS) 方法。经正己烷-乙酸乙酯(1:1, V/V) 提取目标化合物后 结合 H₂SO₄ 去脂, KOH 反萃法对提取液进行净化, 以双(三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷(BSTFA-TMCS, 99:1, V/V) 为衍生试剂对羟基多氯联苯进行硅烷化衍生后, 在 SIM 模式下进行 GC/MS 分析。本方法检出限为 2 μg/kg。在 3 种添加水平 2.0 5.0 和 20.0 μg/kg 下 小鼠肌肉和血液中 3 种羟基多氯联苯的回收率范围为 73.2% ~ 113.2%; 相对标准偏差为 1.53% ~ 10.4%。本方法可用于小鼠腹腔注射多氯联苯后 体内多氯联苯羟基代谢物的检测。

关键词 羟基多氯联苯; 肌肉; 血液; 气相色谱/质谱联用

1 引 言

羟基多氯联苯(OH-PCB) 是持久性有机污染物多氯联苯(PCB) 在生物体内的代谢产物之一^[1]。多氯联苯作为一种人工合成的有机化合物 被广泛用于电力、化工等领域 因为高滞留性 高毒性 各国在上世纪 70 年代相继禁止了多氯联苯的生产和使用 据估计在多氯联苯的使用年代 全世界每年可能至少有 25000 吨流失于环境中 除此之外含多氯联苯设备损坏后的泄露 垃圾处理、废水处理以及 PVC 生产中多氯联苯副产物的排放也成为环境中多氯联苯蓄积的来源^[2,3]。多氯联苯进入生物体后 经细胞色素 P450 氧化酶系统的辅助作用 在肝脏中完成代谢 主要代谢产物为羟基多氯联苯^[4]。近年来 研究者已从鲸鱼脑、海豹和北极熊等野生动物以及人体组织中检测出了羟基多氯联苯^[5~9] 并且羟基多氯联苯能够影响生物体内甲状腺激素水平^[10] 具有类雌激素效应^[11] 并且能影响神经细胞发育^[12]。因此 羟基多氯联苯备受关注。

建立快速、准确、灵敏的分析方法 不仅可以确定生物体内羟基多氯联苯含量 并且有助于反应生物体中多氯联苯真实污染水平。目前 检测羟基多氯联苯多采用重氮甲烷、碘丙烷等衍生后进行 GC-MS 检测^[4,5]。本研究前处理过程中采用混合溶剂萃取, H₂SO₄ 去脂, KOH 溶液反萃等提取浓缩目标化合物 硅烷化衍生后 采用 DB-17MS 柱对羟基多氯联苯进行分离 在 SIM 模式下进行 GC/MS 检测 对小鼠肌肉和血液中羟基多氯联苯的检出限为 2 μg/kg 并将此方法用于注射多氯联苯后小鼠组织中羟基多氯联苯的检测。本方法能满足生物组织中痕量羟基多氯联苯检测的需要。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent 6890N/5973 I 气相色谱/质谱联用仪(美国 Agilent 公司) , TDL-60B 型离心机(上海九亭离心机厂) , N-EVAPTM111 型氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司) , 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂) , LG100B 理化干燥箱(上海实验仪器总厂) 。

4-羟基-PCB112 3-羟基-PCB101 4-羟基-PCB106(美国 Accustandard 公司) , 双(三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺-三甲基氯硅烷(BSTFA/TMCS, 99:1, V/V, Supleco 公司) , 正己烷、乙酸乙酯(美国 Tedia 公司) ,

2009-10-12 收稿; 2010-03-19 接受

* E-mail: caiyouqiong@163.com

H₂SO₄、KOH(优级纯,国药集团)。

2.2 样品制备

昆明系雄性小白鼠肌肉完全切碎后,匀浆备用;昆明系雄性小白鼠眼球取血,混匀。于-22℃下保存。

称取(1±0.05)g样品于50mL离心管中,加入15mL正己烷-乙酸乙酯(1:1,V/V),漩涡30s,超声10min,4000r/min离心10min,上层有机相转移至鸡心瓶中,加入15mL正己烷-乙酸乙酯(1:1,V/V),再重复操作一次,合并有机相,将提取液旋转蒸发至干,用2mL正己烷洗涤鸡心瓶,重复操作两次,洗涤液转入具塞玻璃离心管中,加入3mL浓H₂SO₄,振摇充分,2000r/min离心10min,正己烷层移取至150mL分液漏斗中,向H₂SO₄层中加入5mL正己烷,重复操作一次,合并正己烷层于分液漏斗中,向分液漏斗中加入10mL0.5mol/LKOH溶液,充分振荡,静置分层后将下层转移至150mL梨形分液漏斗中,向正己烷层中加入10mL0.5mol/LKOH溶液,重复操作一次,合并KOH层,向KOH层中加入4mL5.0mol/LHCl,调至酸性,加入5mL正己烷,充分振荡,静置分层,将上层正己烷层过无水Na₂SO₄柱,收集于具塞玻璃管中,向分液漏斗中加入5mL正己烷,重复操作一次,经无水Na₂SO₄脱水后的正己烷于氮气流下吹干。

向吹干的具塞玻璃管中加入100μL衍生试剂BSTFA-TMCS,在60℃下衍生40min,于氮气流下吹干残留物,加入1mL正己烷,待上机分析。

2.3 色谱-质谱条件

DB-17MS色谱柱(30m×0.25mm×0.25μm,Agilent公司);不分流进样;载气:高纯氦气(99.999%);流速:1.0mL/min;进样口温度:280℃;柱始温100℃,保持3min,以20℃/min升温至200℃,再以4℃/min升温至270℃,总运行时间25.5min。

EI离子源温度:230℃;四极杆温度:150℃;EI电压:70eV;监测模式:SIM模式;传输线温度:280℃;溶剂延迟:3min。

2.4 标准曲线

用正己烷分别配制2,5,10,20,50,100和200μg/L的3种标准品的混合工作溶液,分别吸取各浓度标准溶液1mL,氮气流下吹干,衍生后进行GC/MS分析,以浓度为横坐标,以羟基多氯联苯衍生物的峰高响应值为纵坐标,绘制标准曲线。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理优化

在研究中采用正己烷-乙酸乙酯(1:1,V/V)提取目标化合物,能满足痕量分析的要求^[13]。

正己烷-乙酸乙酯提取液旋转蒸发至干后,用正己烷溶解残留物,向正己烷层中加入浓H₂SO₄,去除脂类杂质。根据羟基多氯联苯中酚羟基的弱酸性,本研究采用KOH溶液反萃,将羟基多氯联苯转变为盐,转移至水相。本研究分别以0.1,0.2,0.5和1.0mol/LKOH溶液进行反萃,考察KOH浓度对目标化合物回收率的影响。结果表明,3-羟基-PCB101、4-羟基-PCB112和4-羟基-PCB106的回收率在此KOH浓度范围内基本无改变,分别约为95%,76%和74%,实验确定KOH浓度为0.5mol/L。

由于羟基多氯联苯的弱极性使其不适于直接进行气相分析,需要进行衍生,以使其更易于气化完全,本研究中采用BSTFA-TMCS为衍生试剂,在60℃衍生40min^[13]。

3.2 方法精密度与准确度

在确定的色谱和质谱条件下,对各浓度(2,5,10,20,50,100和200μg/L)混合标准工作溶液衍生后进行分析,得到各目标化合物的检测线性范围和线性回归方程(表1)。结果表明,在2~200μg/L范围内,线性关系良好,以3倍信噪比计算得其检出限为2μg/kg。

以小鼠肌肉和血液为空白样品,加入的质量浓度分别为2,5和20μg/kg,每个质量浓度进行6次平行测定,小鼠肌肉和血液中3种化合物加标色谱图见图1,3种目标化合物的回收率以及相对标准偏差见表2。

表 1 线性回归方程与回归系数

Table 1 Regression equations and correlation coefficient

化合物 Analytes	回归曲线 Regression equations	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linearity range ($\mu\text{g/L}$)	保留时间 Retention time (min)	定量离子 Qualitative ion (m/z)	定性离子 Quantitative ion (m/z)
3-羟基-PCB101 3-OH-2',4',5',5'-PeCB	$y = 18.0x - 87.2$	0.997	2 ~ 200	17.90	399	401, 414
4-羟基-PCB112 4-OH-2',3',3',4',5'-PeCB	$y = 11.8x - 6$	0.999	2 ~ 200	19.70	399	401, 414
4-羟基-PCB106 4-OH-2',3',3',5',6'-PeCB	$y = 18.2x - 49.8$	0.998	2 ~ 200	21.91	399	401, 414

x: 浓度 (Concentration) $\mu\text{g/L}$; y: 衍生物峰高响应值 (The peak height abundance of hydroxy-PCBs derivatives), Hz.

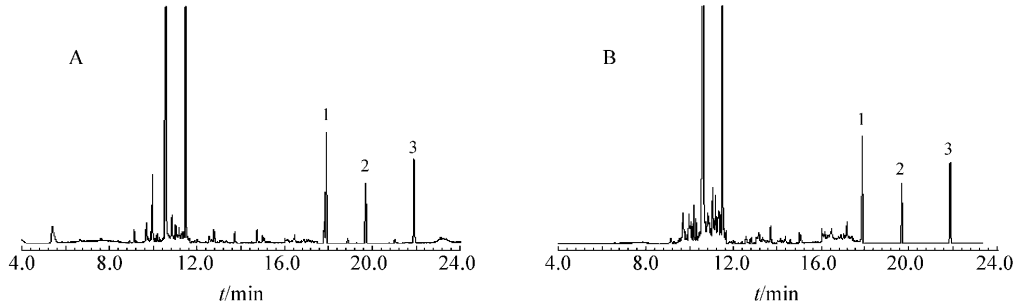


图 1 20 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下小鼠血液 (A) 和骨肌肉 (B) 加标色谱图

Fig. 1 Chromatography of mouse muscle blood (A) and muscle (B) at spiked level of 20 $\mu\text{g/kg}$

1. 3-羟基-PCB101 (3-OH-2',4',5',5'-PeCB); 2. 4-羟基-PCB112 (4-OH-2',3',3',4',5'-PeCB); 3. 4-羟基-PCB106 (4-OH-2',3',3',5',6'-PeCB)。

表 2 小鼠肌肉和血液加标的 2 $\mu\text{g/kg}$ 回收率结果

Table 2 Recoveries results of hydroxy-PCBs in mouse muscle and blood at spiked level of 2 $\mu\text{g/kg}$

化合物 Analytes	肌肉 Muscle		血液 Blood	
	加标回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	加标回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
3-羟基-PCB101 3-OH-2',4',5',5'-PeCB	101.0	8.9	113.2	7.0
4-羟基-PCB112 4-OH-2',3',3',4',5'-PeCB	75.7	1.9	75.7	1.5
4-羟基-PCB106 4-OH-2',3',3',5',6'-PeCB	76.1	1.8	74.3	3.2

3.3 方法应用

将本方法用于注射 PCB 101 后小鼠体内 3-羟基-PCB101 的检测。按照 10 mg/kg 的体重比例,采用腹腔注射法对昆明系雄性小鼠进行暴露,一周内小鼠血液以及肌肉等各组织中多氯联苯的蓄积量以及羟基多氯联苯的生成量范围见表 3。

表 3 小鼠组织内多氯联苯以及羟基多氯联苯浓度

Table 3 Concentrations of 2',4',5',5'-PeCB and its metabolites in mouse tissues

组织 Tissues	PCB101 2',4',5',5'-PeCB ($\mu\text{g/g}$)	3-羟基-PCB101 3-hydroxy-2',4',5',5'- PeCB ($\mu\text{g/g}$)	组织 Tissues	PCB101 2',4',5',5'-PeCB ($\mu\text{g/g}$)	3-羟基-PCB101 3-hydroxy-2',4',5',5'- PeCB ($\mu\text{g/g}$)
心 Heart	8.3 ~ 11.8	0 ~ 0.04	肾 Kidney	14.2 ~ 35.8	0.004 ~ 0.08
肝 Liver	9.2 ~ 26.1	0.16 ~ 1.16	胃 Stomach	23.1 ~ 34.1	0.1 ~ 3.43
脾 Spleen	8.5 ~ 13.8	0 ~ 0.08	血 Blood	1.28 ~ 1.41	0.036 ~ 0.052
肺 Lung	12.7 ~ 19.2	0.03 ~ 0.17	肌肉 Muscle	5.13 ~ 8.23	0.002 ~ 0.007

本实验采用了 H_2SO_4 去脂、0.5 mol/L KOH 反萃法能够有效去除杂质,节省了有机溶剂用量,并且缩短了净化时间。本研究确定的衍生方法时间短,衍生效率能满足痕量检测的需要。本研究确定的方法成功用于腹腔注射 PCB101 (注射剂量为 10 mg/kg) 后小鼠血液和肌肉中 3-羟基-PCB101 的检测。

References

- 1 YANG Fang-Xing(杨方星) ,XU Ying(徐 盈) . *Prog. Chem.* (化学进展) ,**2005** ,17(4) : 740 ~ 748
- 2 FANG Jie(方 杰) ,WANG Kai-Xiong(王凯雄) . *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学) ,**2007** ,35(11) : 1607 ~ 1613
- 3 CHEN Jian-Min(陈建民) . *Environment Toxicology*(环境毒物学) . Tianjin(天津) : Tianjin University Press(天津大学出版社) ,**2007**: 158 ~ 163
- 4 Jee E H ,Heesoo P ,Song J P ,Won L. *J. Chromatogr. B* ,**2007** ,856(1-2) : 1 ~ 8
- 5 Tatsuya K ,Takanori S ,Tadasu K Y ,Shin T ,Shinsuke T. *Mar. Pollut. Bull.* ,**2007** ,54(7) : 963 ~ 973
- 6 June S P ,Olga I K ,Dianne K ,Myrto P. *Mar. Environ. Res.* ,**2009** ,67(3) : 129 ~ 135
- 7 Sandala G M ,Sonne-Hansen C ,Dietz R ,Muir D C G ,Valters K ,Bennett E R ,Bornd E W ,Letcher R J. *Sci. Total. Environ.* ,**2004** ,331(1-3) : 125 ~ 141
- 8 Fernandez M F ,Kiviranta H ,Molina-Molina J M ,Laine O ,Lopez-Espinosa M J ,Vartiainen Olea T N. *Chemo.* ,**2008** ,71(6) : 1196 ~ 1205
- 9 June-Soo P ,Åke B ,Linda L ,Maria A ,Anton K ,Jan P ,Beata D ,Tomas T ,Judith C M ,Irva H P. *Chemo.* ,**2008** ,70(9) : 1676 ~ 1684
- 10 Seo-Hee Y ,Kelly J G ,Ruby B R ,Thomas Z. *Mol. Cell. Endocrino.* ,**2006** ,257: 26 ~ 34
- 11 Anne S M ,Marte B ,Morten S ,Augustine A. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* ,**2007** ,68(3) : 351 ~ 360
- 12 Noriaki S ,Wataru M ,Toshiharu I ,Noriyuki K. *Neurotoxicolo.* ,**2006** ,27(3) : 176 ~ 183
- 13 SHI Yong-Fu(史永富) ,LIN Hong(林 洪) ,HUANG Dong-Mei(黄冬梅) ,CAI You-Qiong(蔡友琼) ,WANG Yuan(王媛) ,QIAN Bei-Lei(钱蓓蕾) . *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报) ,**2009** ,28(5) : 568 ~ 571

Determination of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls in Mouse Tissues and Blood by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

SHI Yong-Fu¹ ,LIN Hong¹ ,HUANG Dong-Mei² ,Gong Qian¹ ,CAI You-Qiong^{* 2} ,WANG Yuan² ,QIAN Bei-Lei²

¹ (College of Food Science and Engineering ,Ocean University of China ,Qingdao 266003)

² (Fishery Products Quality Inspection and Test Centre(Shanghai) ,Ministry of Agriculture of China , East China Sea Fishery Research Institute ,Chinese Academy of Fishery Sciences ,Shanghai 200090)

Abstract A method has been established to determine three hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls(PCBs) in mouse muscle and blood by GC/MS. Target compounds were extracted by using hexane-ethyl acetate as extracting solvents(1:1 , V/V) . To obtain satisfactory peak shape and separation efficiency , sulfuric acid and alkaline stripping solution were used to remove the impurities. Derivatizing reagent was *N,O*-bis(trimethylsilyl) -trimethylchlorosilane (BSTFA-TMCS , 99:1 , V/V) . The target compounds were analyzed by GC/MS under SIM mode after silylation derivitization. The average recoveries of 3-hydroxy-2,2',4',5,5'-PeCB , 4-hydroxy-2,3,3',4',5'-PeCB and 4-hydroxy-2,3,3',5',6'-PeCB ranged from 73.2% to 113.2% spiked at 3 levels of 2 , 5 , 20 μg/kg in muscle and blood. The range of relative standard deviations(RSD) in spiked samples was 1.5% - 10.4% . And the detection limit of the method was 2 μg/kg. This established method has been successfully applied to the determination of hydroxylated metabolite in mouse tissues after intraperitoneal injection of 2,2',4',5,5'-PeCB at the dose of 10 mg/kg.

Keywords Hydroxylated polychlorinated biphenyls; Muscle; Blood; Gas chromatography/mass spectrometry

(Received 12 October 2009; accepted 19 March 2010)