

气相色谱-质谱法检测人血清样品中新型含氯阻燃剂德克隆

任国发^{* 1 2} 罗湘凡² 马盛韬¹ 孙延枫² 于志强^{* 1} 盛国英^{1 2} 傅家谟^{1 2}¹(中国科学院广州地球化学研究所有机地球化学国家重点实验室,
广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640)²(上海大学环境与化学工程学院环境污染与健康研究所, 上海 200444)

摘要 采用液液萃取, 气相色谱-负离子化学电离质谱技术, 建立了人体血清样品中新型含氯阻燃剂德克隆 (DP) 的分离分析方法。血清样品蛋白质变性后, 采用液液萃取法提取脂肪, 再采用浓 H₂SO₄ 破坏法去除大部分脂肪, 最后采用酸性硅胶柱进一步净化。净化后的样品经浓缩富集, 采用气相色谱-负离子化学电离质谱仪测定样品中 DP 两种同分异构体的含量。结果表明: 本方法的加标回收率为 70.2% ~ 85.7%; 仪器检出限为 0.5 ~ 0.7 pg; 方法检出限为 15 ~ 20 pg, 适合实际样品中该类污染物的分离分析。采用本方法测定了某电子垃圾拆解工人和对照区居民血清中的 DP 浓度水平, 分别为 7.8 ~ 465 ng/g 脂肪和 0.93 ~ 50.5 ng/g 脂肪。

关键词 德克隆; 新型有机污染物; 气相色谱; 负离子化学源; 血清

1 引言

德克隆 (DP) 是一种高氯代脂环族含卤阻燃剂, 含氯质量分数可达 65%。工业用 DP 是由 2 mol 六氯环戊二烯和 1 mol 1,5-二氯环辛烯经狄尔斯-阿德尔反应合成。工业 DP 由两种空间异构体组成, 分别是 *syn*-和 *anti*-构型。其化学结构示意图如图 1。

DP 是 Hooker 公司作为 Mirex 的替代品于 20 世纪 60 年代生产的, 主要用作阻燃剂^[1]。其阻燃方式与多溴联苯醚 (PBDEs) 相似, 同属于添加型阻燃剂。DP 具有典型持久性有机污染物的特性: 高亲脂性、不宜光解和生物分解, 且可以在鱼体中富集。对鱼类有明显的生态毒理效应; 对兔子的真皮暴露实验也显示出其潜在的生殖毒性^[2], 被认为是一类新型有机污染物。

尽管 DP 已经被使用了几十年, 然而直到近年才得到广泛关注。DP 首先被发现于大湖地区的大气、沉积物和鱼体中^[3-6], 此后, 亚洲和欧洲的一些环境介质中也发现了这类污染物^[7,8]。目前, 已开展了环境样品中该类污染物的研究^[8,9], 但人体样品中 DP 的研究还未见报道。

本研究采用液液萃取富集, 经脂肪提取, 去脂净化步骤, 应用气相色谱-负离子化学电离质谱技术, 建立了人体血清样品中 DP 的分析方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

7890N 联 5975C 色质联用仪 (美国安捷伦公司); 聚四氟乙烯离心管 (美国橡树岭公司)。丙酮、正己烷、二氯甲烷、乙醇、异丙醇和甲基叔丁基醚 (MTBE) 均为农残级试剂 (德国 Fluka 公司); HCl (37%) 和 H₂SO₄ (99.9% 德国 Sigma-Aldrich 公司); 硅胶 (0.24 ~ 0.098 mm 粒径, 63 ~ 200 目, 德国 Merck 公司); KOH、无水 Na₂SO₄ 和 KCl (分析纯, 广东西陇化工厂)。DP 单标 (*syn*-DP 和 *anti*-DP) 及回收率指示

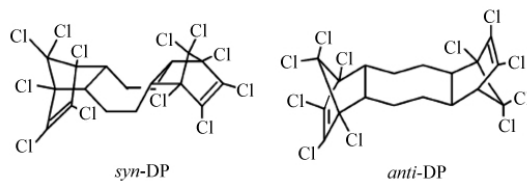


图 1 *syn*-DP 和 *anti*-DP 的结构

Fig. 1 Structure of *syn*-dechlorane plus (DP) and *anti*-DP

物标样 (PCB-209) 及内标 (^{13}C -PCB-208) 均购自剑桥同位素实验室。

2.2 实验用品的准备

玻璃仪器用洗衣粉水溶液浸泡后烘干,再用热洗液(含 5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ 的 H_2SO_4 溶液)清洗,放置 5 h 后用自来水洗净,再用去离子水清洗,烘干后,经 450 °C 焙烧 5 h 后使用。玻璃棉、无水 Na_2SO_4 和 KCl 经 600 °C 焙烧 5 h 后,密封于干燥器中保存备用。棉花经二氯甲烷索氏抽提 72 h 后备用。柱活塞(聚四氟乙烯材质)、镊子、药勺及氮吹针头均先用丙酮后用正己烷超声洗净。

2.3 酸性硅胶柱的制备

硅胶在专用烘箱 120 °C 活化 12 h 后,加浓 H_2SO_4 (2:1, V/V) 酸化,摇匀平衡过夜,置于干燥器中备用。采用湿法将制备好的酸性硅胶装入净化小柱(20 cm × 0.8 cm),从上到下分别装入 1 cm 无水 Na_2SO_4 , 1 cm 中性硅胶, 5.5 cm 酸性硅胶,用正己烷预淋洗后待用。

2.4 样品处理

2.4.1 脂肪提取 血清样品提前 12 h 从 -20 °C 冰箱中取出后于 4 °C 解冻,准确量取 5 mL 血清到 50 mL 聚四氟乙烯圆底旋盖离心管中,加入回收率指示物(PCB-209), 1.0 mL 6 mol/L HCl 溶液,振荡,然后迅速加入 6 mL 异丙醇溶液,剧烈振荡,再加入 6 mL 正己烷-甲基叔丁基醚(1:1, V/V) 混合溶液,振荡,离心,分离出有机相至另一相同离心管中。无机相再分别用 6 mL 和 3 mL 上述混合溶液萃取两次,合并 3 次所得有机相,用 5 mL 1% KCl 溶液洗涤,分离出干净的有机相后, KCl 溶液再用 5 mL 正己烷-甲基叔丁基醚(1:1, V/V) 的混合溶液反萃取一次,并与上述干净的有机相合并,无机相废弃回收。合并后的有机相经无水 Na_2SO_4 除水干燥后,在旋转蒸发仪上浓缩至约 1 mL,转移到细胞瓶中,用柔和的氮气吹干溶剂,放入干燥器中恒重,称量可萃取脂肪的重量。

2.4.2 去脂净化 用约 5 mL 正己烷将上述恒重好的脂肪溶解并转移到离心管中,加入 2 mL 浓 H_2SO_4 , 振荡,离心,上层有机溶液转移到另一根离心管中,再加入浓 H_2SO_4 破坏脂肪 2~3 次,至有机溶液完全无色。合并几次的浓 H_2SO_4 层,用正己烷萃取 3 次,与已经分离的有机相合并。有机相在旋转蒸发仪上浓缩至约 1 mL,经酸性硅胶柱净化,收集 8 mL 正己烷和 10 mL 正己烷-二氯甲烷(1:1, V/V) 的混合液洗脱组分,再次旋转浓缩至 0.5 mL 后,转移到细胞瓶中,以柔和的氮气吹至将干,加入进样内标,最后吹干定容至 20 μL ,密封于细胞瓶中。

2.5 色谱-质谱条件

DB-5HT 高温毛细管柱(15 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 载气为 He 气,恒流模式,柱流量为 1.2 mL/min,无分流进样,进样量为 1 μL ; 进样口温度 280 °C。柱始温 110 °C(1 min),以 12 °C/min 程序升至 210 °C(1 min),5 °C/min 升至 250 °C(3 min),0.5 °C/min 升至 275 °C(5 min),15 °C/min 升至 300 °C(5 min)。

NCI 离子源:反应气为甲烷;离子源温度 200 °C;四极杆温度 150 °C;界面温度 300 °C。在仪器分析时,以 PCB-209 为回收率指示物, ^{13}C -PCB-208 为内标,采用选择离子监测模式,对样品中该化合物进行定性与定量分析,监测离子分别为 PCB-208: 473/475, PCB-209: 498/500, DP: 651.7/653.7。

3 结果与讨论

3.1 脂肪提取条件的优化

由于人体血液样品中环境有机污染物(如多溴联苯醚、有机氯农药等)的含量低,且样品基质非常复杂,以往的实验大多采用分液漏斗进行液液萃取^[10]。然而在萃取过程中样品很容易乳化,需要加入极性相对较强的溶剂进行破乳。本实验采用增加异丙醇的量进行破乳,这增加了可萃取有机相的量。且异丙醇极性较强,不容易吹干,给脂肪的恒重带来很大麻烦。为此,本实验选用聚四氟乙烯离心管进行液液萃取,并采用普通低速离心机进行离心破乳,可大大减少萃取液中极性溶剂的使用量,经济实用,且不影响脂肪的提取。

3.2 去脂净化条件的优化

常用的人体样品的去脂净化方法有破坏性去脂(如浓 H_2SO_4 或浓 H_2SO_4 酸性硅胶柱去脂)和非破

坏性去脂(凝胶色谱柱去脂)两种形式^[11]。本实验对比了浓 H₂SO₄ 破坏净化和重复酸性硅胶柱去脂净化两种方法。结果表明,两种方法对 DP 的加标回收率相差不大。但是采用重复酸性硅胶柱去脂净化后,不同样品基质加标回收率的重现性不佳。例如当采用小牛血清基质加标时,各目标化合物的回收情况良好,而当采用真实的背景人血加标时,同批次目标化合物的回收率重现性很差。其原因可能是人血样品基质比小牛血清复杂(同样体积的两种基质,可萃取脂肪量相差 5 倍),人血样品中的脂肪酸、胆固醇等物质易在净化过程中堵塞酸性硅胶小柱,造成目标化合物回收率重现性不好。本研究采用浓 H₂SO₄ 破坏法进行去脂。

3.3 标准曲线、检出限及回收率

采用逐级稀释法配制 1, 2, 10, 25, 50 和 100 μg/L 标准溶液,内标浓度为 20 μg/L,用内标法对目标化合物进行定量分析,各目标化合物的峰面积比和浓度比之间建立的校正曲线见表 1。将标准溶液稀释,取信噪比大于 5 时的标样连续进样 5 次,计算标准偏差。根据检出限(LOD) = 3.36S,计算得仪器检出限为 0.5 ~ 0.7 μg/L。方法检出限为 15 ~ 20 pg。

采用两种基质(5 mL 新鲜胎牛血清和 5 mL 背景人群混合血清样品)进行加标实验。实验表明,小牛血清基质加标回收率很好,基本都能达到 90% 以上,

与空白加标回收情况类似。这可能是由于胎牛血清基质相对干净(平均脂肪量为 0.09%),对目标化合物的干扰小。考虑到实际血清样品的基质要相对复杂(平均脂肪量为 0.5%),因此基质加标实验采用背景地区混合人血液样品。取 5 mL 背景人群血清样品 4 组,添加量分别为 0(基质空白)、0.2、0.4 和 2.0 ng 标准品,每组平行样品 3 个,采用上述建立的方法进行全流程分析,计算回收率。结果显示,作为背景区

的混合血液样品中 DP 可以被部分定性检出,但是浓度未达到定量分析的水平。其它 3 组基质加标实验的回收情况见表 2。结果显示,DP 两种异构体的加标回收率大于 70%,满足实际样品中该类化合物的分析要求。

3.4 实际样品的分析

利用本方法对 40 份血清样品(20 个电子垃圾拆解工人,20 个对照区居民)进行了检测。图 2 是一张典型电子垃圾拆解工人血液样品的选择离子色谱图。采用本方法进行样品处理后,目标化合物同样品基质可以得到很好的分离,适合实际样品中该类化合物的分离分析。

实际样品的分析结果显示,在所分析的所有工人和对照区居民的血液中 DP 两种同系物都有检出,说明 DP 这类化合物可以在人体中蓄积。而作为背景区的混合血液样品中 DP 可以被部分定性检出,但是浓度未达到定量分析水平。DP 各同系物以及总 DP 含量的中值、均值和范围见表 3。电子垃圾拆解工人和对照区居民 DP 的总浓度范围分别为 7.8 ~ 465 ng/g 脂肪和 0.93 ~ 50.5 ng/g 脂肪,工人血液中 DP 的浓度水平明显高于对照区居民。

表 1 DP 两种同系物的工作曲线、保留时间和相关系数

Table 1 Retention time regression equation and correlation coefficients of the two DP isomers

化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient
<i>syn</i> -DP	25.4	$y = 0.9072x + 0.0148$	0.9998
<i>anti</i> -DP	26.5	$y = 0.9953x + 0.0288$	0.9991

表 2 背景人血清样品的加标回收率

Table 2 Recovery of DP in spiked human serum sample

化合物 Compound	低 Low (0.2 ng)	中 Middle (0.4 ng)	高 High (2.0 ng)
	回收率 Recovery ^a (%)	回收率 Recovery (%)	回收率 Recovery (%)
<i>syn</i> -DP	85.8 ± 8.4	79.5 ± 5.4	87.1 ± 5.7
<i>anti</i> -DP	72.6 ± 5.7	75.6 ± 5.3	70.2 ± 2.7

a: 均值 ± 标准偏差 (Average recovery ± SD)。

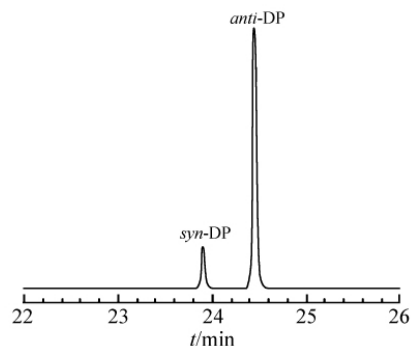


图 2 典型电子垃圾拆解工人血液样品选择离子(m/z 651.7) 色谱图

Fig. 2 Representative selected ion mass (m/z 651.7) chromatogram for human serum

表 3 电子垃圾拆解工人和附近居民血液中 DP 的浓度(ng/g 脂肪)

Table 3 DP concentrations(ng/g lipid) in serum samples from E-waste dismantling region and a nearby region

化合物 Compound	中值 Median Guiyu Haojiang		均值 Mean Guiyu Haojiang		最小值 Minimum Guiyu Haojiang		最大值 Maximum Guiyu Haojiang	
	<i>syn</i> -DP	17.1	5.1	16.2	4.3	2.7	0.35	236
<i>anti</i> -DP	21.2	8.6	22.5	7.5	5.1	0.54	229	32.9
ΣDP ^a	42.6	13.7	39.8	11.8	7.8	0.93	465	50.5

a: *syn*-DP 和 *anti*-DP 总和(The sum of *syn*-DP and *anti*-DP) .

References

- 1 <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/dechlorp/c15635tc.htm>
- 2 Occidental Chemical Corporation (OxyChem) , Dechlorane Plus Manual. **2005**
- 3 Hoh E , Zhu L Y , Hites R A. *Environ. Sci. Technol.* , **2006** , 40(4) : 1184 ~ 1189
- 4 Gauthier L T , Hebert C E , Weseloh D V C , Letcher R J. *Environ. Sci. Technol.* , **2007** , 41(13) : 4561 ~ 4567
- 5 Qiu X H , Marvin C H , Hites R A. *Environ. Sci. Technol.* , **2007** , 41(17) : 6014 ~ 6019
- 6 Sverko E , Tomy G T , Marvin C H , Zaruk D , Reiner E , Helm P A , Hill B , McCarry B E. *Environ. Sci. Technol.* , **2008** , 42(2) : 361 ~ 366
- 7 Qiu X H , Hites R A. *Environ. Sci. Technol.* , **2008** , 42(1) : 31 ~ 36
- 8 Ren N Q , Sverko E , Li Y-F , Zhang Z , Harner T , Wang D G , Wan X N , Mccarry B E. *Environ. Sci. Technol.* , **2008** , 42(17) : 6476 ~ 6480
- 9 Ren G F , Yu Z Q , Ma S T , Li H R , Peng P A , Sheng G Y , Fu J M. *Environ. Sci. Technol.* , **2009** , 43(24) : 9453 ~ 9457
- 10 QU Wei-Yue , BI Xin-Hui , SHENG Guo-Ying , LU Shao-You , FU Jia-Mo(屈伟月 , 毕新慧 , 盛国英 , 陆少游 , 傅家谟) . *Chinese J. Anal. Chem.* , (分析化学) , **2007** , 35(7) : 1015 ~ 1017
- 11 Hovander L , Athanasiadou M , Asplund L , Jensen S , Wehler E K. *J. Anal. Toxicol.* , **2000** , 24(8) : 696 ~ 703

Quantification of Dechlorane Plus in Human Serum by Gas Chromatography Coupled with Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry

REN Guo-Fa^{*1,2} , LUO Xiang-Fan² , MA Sheng-Tao¹ , SUN Yan-Feng² ,
YU Zhi-Qiang^{*1} , SHENG Guo-Ying^{1,2} , FU Jia-Mo^{1,2}

¹(State Key Laboratory of Organic Geochemistry , Guangdong Key Laboratory of Environment and Resources ,
Guangzhou Institute of Geochemistry , Chinese Academy of Sciences , Guangzhou 510640)

²(Institute of Environmental Pollution and Health , School of Environment and Chemical Engineering ,
Shanghai University , Shanghai 200444)

Abstract A gas chromatography coupled with negative chemical ionization mass spectrometric(GC-NCI-MS) method was developed for the determination of two dechlorane plus (DP) isomers in human serum sample. Target compound and serum lipid were extracted by lipid-lipid extraction. After the sulfuric acid treatment to remove extracted lipids from the samples , samples were further cleaned up with a silica/sulfuric acid column. Identification and quantification of DP were carried out by MS. The detection limit of instrument was 0.5 - 0.7 pg. The detection limit of the method was 15 - 20 pg per sample. Spiked recoveries of DP in human serum samples were in the range of 70.2% - 85.7%. The developed method was further validated in human serum. DP concentrations were analyzed in 20 electronics dismantling workers and 20 reference humans , total DP concentration was 7.8 - 465 ng/g lipid and 0.93 - 50.5 ng/g lipid , respectively.

Keywords Dechlorane plus; Emerging contaminant; Gas chromatography; Negative chemical ionization; Human serum

(Received 22 June 2010; accepted 9 September 2010)