

气相色谱质谱法同时测定水产品中8种雌激素类化合物

张秀珍, 徐英江, 官向红, 邢红艳, 张世娟, 刘小静

(山东省海洋水产研究所, 山东 烟台 264006)

摘要: 应用气相色谱-质谱建立了同时检测水产品中辛酚、壬酚、双酚A、己烯雌酚、雌酮、17 β -雌二醇、17 α -乙炔雌二醇和雌三醇8种雌激素的方法。样品经乙酸乙酯提取, HLB小柱净化, 经七氟丁酸酐衍生后用电子轰击电离源在SIM模式下进行检测。结果表明, 8种激素化合物在DB-IMS柱上能得到良好的分离, 色谱峰出峰尖锐, 没有杂峰干扰。本方法检出限为0.3~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在空白样品中添加水平为1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 平均回收率为81%~108%, 相对标准偏差(RSD)为6.7%~11.7%。[中国水产科学, 2009, 16(5): 791-797]

关键词: 气相色谱-质谱法; 水产品; 雌激素

中图分类号: X171

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0791-07

激素类化合物进入生物体后能破坏机体内环境的稳定, 引起生殖障碍、发育异常和某些癌症^[1-3], 其危害已引起全世界广泛关注。环境雌激素(4-壬基酚、双酚A、己烯雌酚、17 α -乙炔基雌二醇)以及内源性雌激素(17 α -雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇、雌酮)在环境中屡有检出, 如果被水产动物吸收, 将会对水产品质量安全造成极大影响。本研究旨在建立一种雌激素的检测方法, 对水产品的雌激素污染状况进行调查研究。

目前激素类物质的测定方法有气相色谱法(GC)^[4]、液相色谱法(LC)^[5]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[6]、液相色谱-质谱法(LC-MS)^[7], 测定的样品以尿液, 饲料、化妆品为主。水产品中激素的检测研究也有报道, 但同时测定这8种雌激素化合物的方法还未见报道。因此迫切需要建立灵敏度高, 准确可靠的检测方法来解决水产品中激素类物质的检测问题。

本研究拟采用GC-MS法同时测定水产品中8种雌激素化合物(辛酚、壬酚、双酚A、己烯雌酚、雌酮、

17 β -雌二醇、17 α -乙炔雌二醇和雌三醇)(分子式见图1), 旨在建立快速、灵敏、准确检测水产品中激素类物质的方法。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

标准品: 辛酚(OP, 纯度 $\geq 90\%$, 美国SUPELCO公司)、4-壬基酚(4-NP, 纯度 $\geq 99.5\%$, Dr.Ehrenstorfer公司)、双酚A(BPA, 纯度 $\geq 98.5\%$, Dr.Ehrenstorfer公司)、己烯雌酚(DES, 纯度 $\geq 99\%$, Dr.Ehrenstorfer公司)、雌酮(E1, 纯度 $\geq 99.0\%$, Dr.Ehrenstorfer公司)、17 α -乙炔雌二醇(E₂, 纯度 $\geq 98.5\%$, Dr.Ehrenstorfer公司)、17 β -雌二醇(β -E₂, 纯度 $\geq 98.8\%$, Dr.Ehrenstorfer公司)和雌三醇(E₃, 纯度 $\geq 98.0\%$, Dr.Ehrenstorfer公司), 上述标准品均用甲醇配成质量浓度为1.00 g/L的标准贮备液, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。临用前, 用甲醇逐级稀释使之成为含上述各标准品质量浓度均为1.00 mg/L的混合标准液。

衍生试剂: 七氟丁酸酐。

收稿日期: 2009-03-16; 修订日期: 2009-05-08.

基金项目: 山东省科技攻关项目(2008GG10005005); “水生动物营养与饲料”泰山学者岗位资助。

作者简介: 张秀珍(1964-), 研究员, 主要从事水产品质量安全研究. Tel: 0535-6958168; E-mail: zxz0535501@126.com

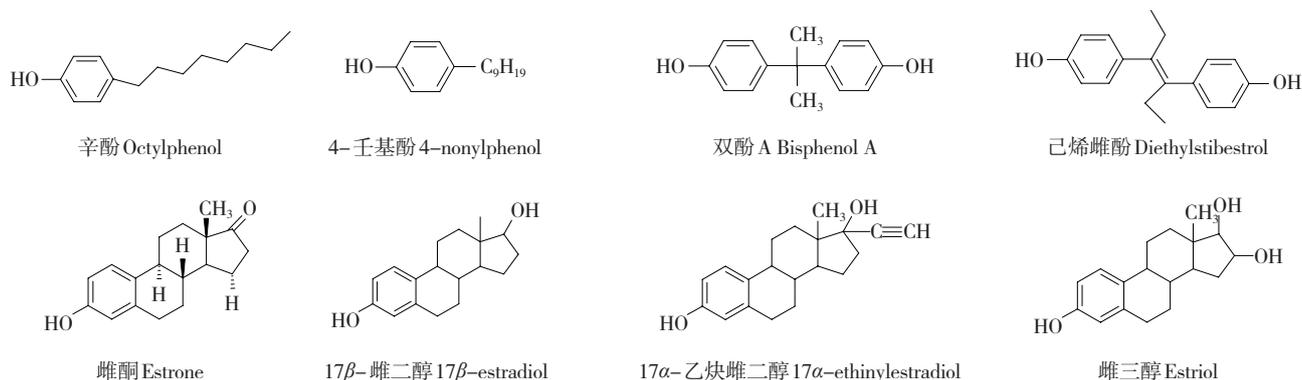


图1 8种雌激素的化学结构式^[3]
Fig. 1 Chemical structural formula of 8 estrogens^[3]

乙酸乙酯(色谱纯),甲醇(色谱纯),正己烷(色谱纯),实验用水均为重蒸水。

1.2 仪器设备

6890N/5973i气相色谱-质谱仪(美国Agilent公司); HLB (Hydrophilic-lipophilic balance) 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)(美国Waters公司); 固相萃取装置(美国SUPELCO公司); 高速分散均质机; 旋转蒸发仪(德国Heidolph公司)。

1.3 样品处理

鲫、草鱼、鲤、中国明对虾、日本对虾、南美白对虾、海参、三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、中华鳖、鮫鳔样品来源于山东省主要养殖场和水产品市场,虾类去头、壳,贝类、蟹类去壳,鱼类去骨、去内脏。取可食部分用高速分散均质机匀浆,备用。

称取匀浆后样品5.0 g于离心管中,加3 mL 10%(W/V)碳酸钠溶液,20 mL乙酸乙酯,均质30 s,超声提取10 min,离心取上清液于梨形瓶中。残渣再加入10 mL乙酸乙酯,重复提取1次,合并上清液,于40℃旋转蒸发至干,用1 mL甲醇溶解残留物,加9 mL水稀释,备用。

1.4 样品净化

依次用10 mL乙酸乙酯、10 mL甲醇和10 mL pH为3的盐酸溶液活化HLB固相萃取小柱,取备用液过柱,控制流速不超过2 mL/min,再依次用10 mL水-甲醇(体积比9:1)和10 mL正己烷淋洗小柱,将

固相萃取柱抽干,最后用5 mL乙酸乙酯洗脱,控制流速不超过2 mL/min。收集洗脱液于5 mL具塞玻璃离心管中,经无水硫酸钠脱水后于40℃水浴中氮吹至1 mL,转移至2 mL样品反应瓶中氮吹至干。

1.5 衍生化

于反应瓶中加入30 μL七氟丁酸酐和70 μL丙酮,盖紧塞子,漩涡混合30 s,于30℃衍生30 min,正己烷定容至0.5 mL,漩涡混合10 s,供GC-MS分析。

1.6 气相色谱-质谱测定

(1) 色谱条件 色谱柱: DB-1MS弹性石英键合毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm),

温度程序如下: 120℃ (2min) $\xrightarrow{15^\circ\text{C}/\text{min}}$ 250℃ $\xrightarrow{5^\circ\text{C}/\text{min}}$ 300℃ (5 min); 进样口温度250℃; 载气: 高纯氦气, 流速为1.0 mL/min; 不分流进样1 μL。

(2) 质谱条件 接口温度280℃, 电离方式EI, 电子轰击能量70 eV, 溶剂延迟时间5 min, 全扫描范围m/z 70~700。模式: 选择离子监测(SIM)。

2 结果与分析

2.1 雌激素类化合物的气相色谱分离

本研究中的8种雌激素类化合物都能在DB-1MS柱上得到良好的分离(图2), 保留时间分别为8.29 min(辛酚)、9.02 min(壬酚)、9.68 min(双酚A)、10.19 min(*cis*-己烯雌酚)、10.93 min(*trans*-己烯雌酚)、13.09 min(17α-乙炔雌二醇)、14.04 min(17β-雌二醇)、14.15 min(雌酮)、14.28 min(雌三醇)。

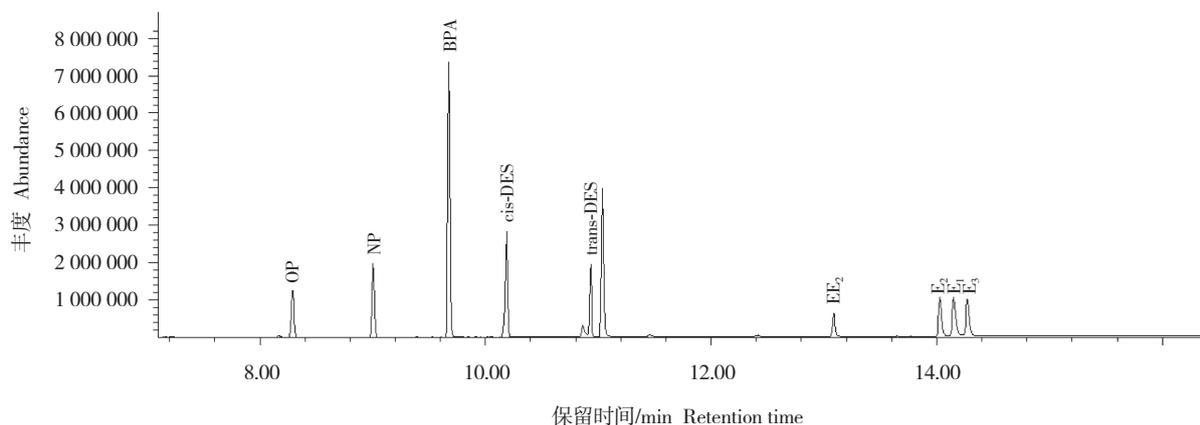


图2 8种雌激素化合物的总离子流图

OP: 辛酚; 4-NP: 4-壬基酚; BPA: 双酚A; DES: 己烯雌酚; E₁: 雌酮; EE₂: 17 α -乙炔雌二醇; E₂: 17 β -雌二醇; E₃: 雌三醇.

Fig. 2 Total ion current chromatograms of the derivatives of eight estrogens

OP: octylphenol; 4-NP: 4-nonylphenol; BPA: bisphenol A; DES: diethylstilbestrol; E₁: estrone; EE₂: 17 α -ethinylestradiol; E₂: 17 β -estradiol; E₃: estriol.

2.2 定量标准曲线

配制浓度分别为1.0、5.0、10.0、50.0、100 $\mu\text{g/L}$ 的雌激素混合标样,衍生后在SIM模式下进行定量检

测。以质量浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线,结果表明各组分皆能保持良好的线性关系(表1)。

表1 8种雌激素的标准曲线

Tab. 1 Calibration curve of eight estrogens

化合物 Compound	曲线方程 Linear equation	相关系数 R
辛酚 Octylphenol	$Y=25\ 500X+325$	0.999
4-壬基酚 4-Nonylphenol	$Y=32\ 400X+331$	0.999
双酚A Bisphenol A	$Y=42\ 500X+782$	0.991
己烯雌 Diethylstilbestrol	$Y=12\ 500X-2310$	0.994
17 α -乙炔雌二醇 17 α -Ethinylestradiol	$Y=23\ 100X+253$	0.991
雌酮 Estrone	$Y=41\ 300X+113$	0.996
17 β -雌二醇 17 β -Estradiol	$Y=32\ 100X+525$	0.998
雌三醇 Estriol	$Y=13\ 500X+341$	0.998

2.3 回收率、精密度和检出限

按照8种物质最高检出限的1倍、2倍和5倍浓度,于空白鲢鱼样品中分别加入1.0 $\mu\text{g/kg}$ 、2.0 $\mu\text{g/kg}$ 和5.0 $\mu\text{g/kg}$ 雌激素混合标样,进行回收率和精密度实验。结果表明,目标化合物的回收率均在80%以上,相对标准偏差(RSD)在6.7%~11.7%之间,说明方法精密度良好。以S/N=3所对应的被测化合物的浓度作为方法的检出限,对8种雌激素而言,仪器检出限均小于1.0 $\mu\text{g/kg}$ (表2)。

2.4 样品分析

应用本法测定了市场购买的鲫、草鱼、鲤、中国

明对虾、日本对虾、南美白对虾、海参、三疣梭子蟹、中华绒螯蟹、中华鳖和鲟鳇样品中这8种雌激素的含量,在测定的60个样品中,有20个样品检出双酚A,其余7种雌激素化合物在这60个样品中均未检出。淡水产品(鲫、草鱼、鲤、南美白对虾、中华绒螯蟹、中华鳖等)基本都没有检出,海水产品(中国明对虾、日本对虾、三疣梭子蟹等)检出率高。双酚A是环境雌激素,近年世界各地的水体中都有发现,双酚A在水产品中的高检出率,表明双酚A在环境中的污染已直接危害到水产品质量安全和人类身体健康。样品中检测结果均值如表3所示。

表2 方法的加标回收率、检出限 ($n=5$) 和定量限 ($n=3$)Tab. 2 Spike recoveries, limits of detection (LOD) ($n=5$) and limits of quantification (LOQ) ($n=3$)

化合物 Compound	添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Spiked Level	平均回收 率/% Mean recovery rate	精密度 /% RSD	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) LOD	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) LOQ	化合物 Compound	添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Spiked Level	平均回收 率/% Mean recovery rate	精密度 /% RSD	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) LOD	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) LOQ
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	1	83	11.4			辛酚 Octyl phenol	1	82	10.5		
	2	87	8.0	0.2	0.5		2	83	9.2	0.2	0.5
	5	108	6.8				5	92	9.0		
4-壬基酚 4-nonylphenol	1	88	10.7			雌酮 Estrone	1	88	10.3		
	2	90	9.3	0.1	0.3		2	87	9.9	0.3	1.0
	5	95	8.1				5	101	8.1		
双酚 A Bisphenol A	1	84	10.6			17 β -雌二醇 17 β -Estradiol	1	85	9.3		
	2	89	9.4	0.1	0.3		2	92	7.1	0.3	1.0
	5	92	9.0				5	104	6.7		
17 α -乙炔 雌二醇 17 α -ethinyl estradiol	1	80	8.5				1	81	9.1		
	2	86	8.4	0.3	1.0	雌三醇 Estriol	2	85	8.7	0.3	1.0
	5	91	7.6				5	97	8.0		

LOD: S/N=3; LOQ: S/N=10

表3 各类水产品中8种雌激素化合物的含量

Tab. 3 The content of each compound in different aquatic products

 $\mu\text{g}/\text{kg}$

样品 Sample	辛酚 OP	壬酚 NP	双酚 A BPA	己烯雌酚 DES	雌酮 E ₁	17 β -雌二醇 E ₂	17 α -乙炔雌 二醇 EE ₂	雌三醇 E ₃
中国明对虾(海水) <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	-	-	5.1	-	-	-	-	-
日本对虾 <i>Penaeus japonicus</i>	-	-	2.6	-	-	-	-	-
海参 <i>Apostichopus japonicus</i>	-	-	2.8	-	-	-	-	-
三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	-	-	4.8	-	-	-	-	-
鲛鳕 <i>Squatina australis</i> Regan	-	-	1.0	-	-	-	-	-

3 讨论

3.1 样品提取试剂的选择

这8种雌激素化合物在弱极性或中等极性的有机溶剂中有较高的溶解性。分别用乙醚、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯和叔丁基甲醚等溶剂萃取,结果表明只有用乙酸乙酯提取时回收率能够大于70%,提取时间从5 min延长到30 min,回收率没有明显变化,说明这8种激素由水相向有机相的转移主要是由其在两相间的分配系数所驱动。同时实验发现在乙酸乙

酯中加入10% (W/V) 碳酸钠溶液能够有效降低干扰,并可将回收率提高到80%以上(表2)。

3.2 样品净化方式的选择

采用固相萃取净化时,目标化合物的回收率与SPE小柱性质及洗脱溶剂性质有关。本研究比较了SLH小柱、石墨炭黑-氨基(Carb/NH₂)小柱和HLB小柱的回收效果。用甲醇配制10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液,取1 mL置35 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至近干,用2 mL 10%甲醇溶解,直接过活化的SLH小柱、Carb/NH₂柱和HLB小

柱,用5 mL乙酸乙酯洗脱,置35℃下氮吹至干,用正己烷定容至1 mL,衍生后上气相色谱-质谱仪测定。结果表明SLH小柱对双酚、己烯雌酚、雌酮、17 β -雌二醇、17 α -乙炔雌二醇和雌三醇回收率良好,但对辛酚和壬酚几乎无回收;石墨炭黑-氨基柱对8种化合物的回收率均低于10%。HLB小柱对所有组分净化

效果和回收率均良好。3种固相萃取小柱的回收率如图3所示。

本实验采用乙酸乙酯作为HLB固相萃取柱的洗脱液,并对所需洗脱液的体积进行了探讨。比较1、2、3、4、5、10 mL乙酸乙酯对洗脱效果的影响,结果表明,5 mL乙酸乙酯可完全洗脱。

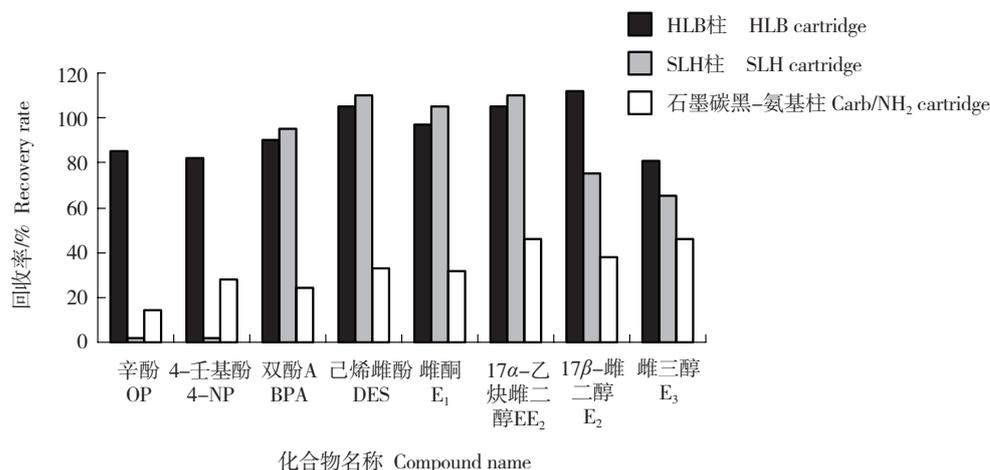


图3 固相萃取柱对8种雌激素回收率的影响

Fig. 3 Recovery rates of eight estrogens by different SPE cartridges

3.3 衍生化条件的选择

本研究中8种雌激素化合物的熔点均高于170℃,不易气化,所以必须先将其衍生化成为易挥发化合物,再用气相色谱-质谱测定。常用的气相色谱衍生化方法有硅烷化、酯化和酰化等。本研究比较了BSTFA(含1%TMCS)、五氟丙酸酐、七氟丁酸酐、五氟苯甲酰氯等衍生试剂的衍生效果,发现用BSTFA衍生时17 α -乙炔雌二醇和雌三醇的响应特别小,灵敏度达不到检测要求(图4),而这2种物质是中国在动物养殖过程中禁止使用的,所以硅烷化衍生不能满足本研究的要求。五氟丙酸酐做衍生化试剂时8种激素的响应都很小,而且谱图杂乱(图5),而用七氟丁酸酐做衍生化试剂各化合物的响应较高而且峰形尖锐、碎片丰富、干扰少(图1)。衍生化反应通常在密闭的小瓶中进行,衍生反应过程常常需要

不含活泼氢的溶剂来提高衍生效率。比较了丙酮、乙酸乙酯、吡啶的衍生化效果,结果表明加丙酮的效果要好于加乙酸乙酯和吡啶的效果。而且对衍生化的温度和时间进行了摸索,发现在30℃条件下衍生30 min效果最好。

4 结论

本研究建立了应用固相萃取-衍生化气相色谱-质谱法测定水产品中8种雌激素化合物的方法,在所选实验条件下,8种化合物在DB-1MS柱上均得到良好的分离。利用EI源对标准品和样品进行检测,色谱出峰尖锐,没有杂峰干扰。方法检出限为0.3~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在空白样品中添加水平1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内,平均回收率为81%~108%,相对标准偏差(RSD)为6.7%~11.7%。

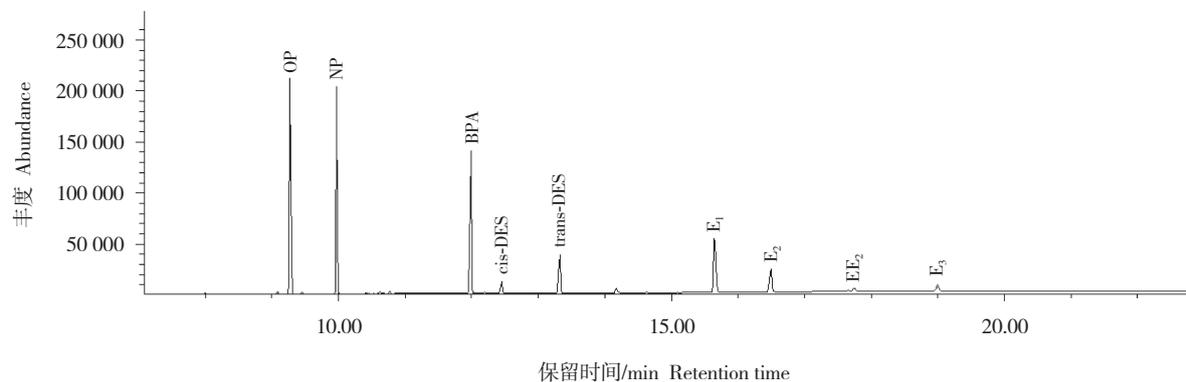


图4 BSTFA 衍生产物的总离子流图

OP: 辛酚; 4-NP: 4-壬基酚; BPA: 双酚 A; DES: 己烯雌酚; E₁: 雌酮; EE₂: 17 α -乙炔雌二醇; E₂: 17 β -雌二醇; E₃: 雌三醇.

Fig. 4 Total ion current chromatograms of the BSTFA derivatives of eight estrogens

OP: octylphenol; 4-NP: 4-nonylphenol; BPA: bisphenol A; DES: diethylstilbestrol; E₁: estrone; EE₂: 17 α -ethinylestradiol; E₂: 17 β -estradiol; E₃: estriol.

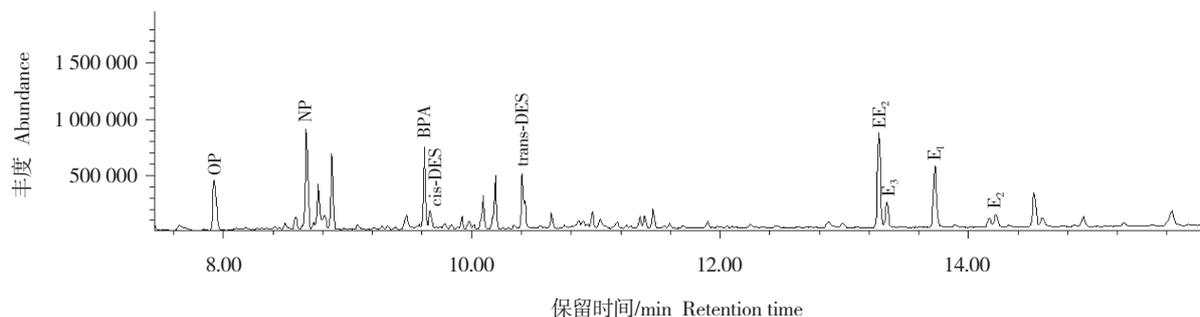


图5 五氟丙酸酐衍生产物的总离子流图

OP: 辛酚; 4-NP: 4-壬基酚; BPA: 双酚 A; DES: 己烯雌酚; E₁: 雌酮; EE₂: 17 α -乙炔雌二醇; E₂: 17 β -雌二醇; E₃: 雌三醇.

Fig. 5 Total ion current chromatograms of the perfluoropropionic anhydride derivatives of eight estrogens

OP: octylphenol; 4-NP: 4-nonylphenol; BPA: bisphenol A; DES: diethylstilbestrol; E₁: estrone; EE₂: 17 α -ethinylestradiol; E₂: 17 β -estradiol; E₃: estriol.

参考文献:

- [1] 黄成, 姜理英, 陈建孟, 等. 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[J]. 色谱, 2008, 26(5): 618-621.
- [2] 赵泽文, 常青, 梁志清. 环境雌激素对健康的影响[J]. 中国临床康复, 2004, 8(9): 1724-1725.
- [3] 张宏, 毛炯, 孙成均, 等. 气相色谱-质谱法测定尿及河底泥中的环境雌激素[J]. 色谱, 2003, 21(5): 451-455.
- [4] 胡伟, 黄荣斌, 陈小君, 等. 用气相色谱考察雌二醇的衍生化方法[J]. 2001, 3: 41-44.
- [5] 林春晓, 王起恩, 刘开钳, 等. 食品中五种性激素的高效液相色谱测定法[J], 中华预防医学杂志, 2003, 37(4): 275-277.
- [6] Helaleh M I H, Takabayashi Y, Fujii S, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric method for separation and detection of endocrine disruptors from environmental water samples [J]. Anal Chim Acta, 2001, 428: 227-234.
- [7] Zhang H, Henion J. Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry using 96-well technology [J]. Anal Chem, 1999, 71: 3955-3964.

Determination of eight estrogens in aquatic products by GC-MS

ZHANG Xiu-zhen, XU Ying-jiang, GONG Xiang-hong, XING Hong-yan, ZHANG Shi-juan, LIU Xiao-jing

(Marine Fisheries Research Institute of Shandong Province, Yantai 264006, China)

Abstract: Gas chromatography-mass spectrometry method (GC-MS) for simultaneous determination of eight estrogens (including octylphenol, 4-nonylphenol, bisphenol A, diethylstilbestrol, estrone, 17β -estradiol, 17α -ethinylestradiol and estriol) in aquatic products has been established. The estrogens were extracted by ethyl acetate and purified on the HLB cartridge, then derived with heptafluorobutyric anhydride, and finally determined using EI-SIM-MS. The results indicate that the eight estrogens can be separated from each other on DB-1MS column with sharp peaks and rare contamination. The LOQs are from 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the average recovery rates range from 81% to 108% with spiking estrogens from 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The Relative standard deviation (RSD) ranges from 6.7% to 11.7%. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 791-797]

Key words: gas chromatography-mass spectrometry; aquatic product; estrogen

欢迎订阅《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办、科学出版社出版的学术期刊,中国精品科技期刊,已被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及NCBI、CABI等20多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容涉及遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化等。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研发人员、研究生、大学生、中学生物学教师等。

2005年,《遗传学报》获得第三届国家期刊奖提名奖,2006-2009年,连续获得中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。自2007年起,《遗传学报》的外文刊名变更为*Journal of Genetics and Genomics*,2008年,《遗传学报》被SCI-E收录。

《遗传学报》(ISSN 1673-8527, CN11-5450/R)为月刊,全年12期,国内邮发代号2-819,国外发行代号:M63。2010年定价50元,全年600元。<http://www.jgenetgenomics.org/>

《遗传》(ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)为月刊,全年12期。国内邮发代号2-810,国外发行代号:M62。2010年定价50元,全年600元。<http://www.Chinagene.cn>

遗传学会会员个人直接向编辑部订阅《遗传学报》和《遗传》,5折优惠,免收邮寄费。

欢迎订阅,欢迎网上注册投稿,欢迎刊登广告

联系地址:北京市北辰西路1号院:中国科学院遗传与发育生物学研究所编辑室

邮政编码:100101;电话:010-64807669;传真:010-64807786

主编:薛勇彪;E-mail:ybxue@genetics.ac.cn

编辑室主任:李绍武 E-mail:swli@genetics.ac.cn