

固相萃取-LC-MS 法检测水中痕量雌激素¹⁾

常 红 胡建英 邵 兵 徐 焯²⁾ 高建峰³⁾ 董民强³⁾

(北京大学城市与环境学系, 北京, 100871)

摘 要 研究了乙腈/水、乙腈/甲醇/水、甲醇/水三种不同流动相的条件下, LC-MS 分析雌酮, 雌二醇, 雌三醇, 炔雌醇四种对象物质的灵敏度, 发现流动相对灵敏度影响较大, 不同流动相的对象物质的仪器检出限分别为: $330\text{--}750\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $100\text{--}300\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$, $50\text{--}100\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. 用固相萃取-LC-MS 检测杭州地区河水, 在 8 个采样点中, 有 7 个检测出了炔雌醇, 其浓度范围在 $1.17\text{--}3.35\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ 之间, 一个采样点检测出雌二醇, 其浓度为 $0.32\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$.

关键词 雌激素, LC-MS, 内分泌干扰物质.

人工合成及天然雌激素在极低浓度下, 显示出极强的内分泌干扰作用, 如天然雌激素雌二醇在 $1\text{--}10\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ^[1], 人工合成的雌激素在 $0.1\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ ^[2,3] 时, 会使一些野生雄性鱼类出现雌性化现象. 环境中雌激素物质的浓度是极其微量的^[4,5], 因此, 建立具有特异性强、灵敏度高的监测方法成为内分泌干扰物质研究领域中的一大课题.

本文建立了固相萃取-LC-MS 法测定环境中痕量天然和合成雌激素的方法, 并对杭州地区水系中四种雌激素类物质的污染水平进行了检测.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2690 液相色谱仪-Micromass ZMD 质谱仪.

雌酮 (E1)、雌二醇 (E2)、雌三醇 (E3) 和炔雌醇 (EE) 均购自日本和光公司. 乙腈、甲醇购自 Fisher 公司 (HPLC 级).

1.2 样品的采集和处理

样品采自杭州地区的苕溪、贴沙河、三堡、南星桥、钱塘江大桥、九溪、浦阳江、富春江. 采集后立即处理, 对于不能立即处理的样品, 加入 1% 福尔马林于 4℃ 冷藏.

取 2L 水样, 经玻璃纤维滤纸 ($0.45\mu\text{m}$) 过滤后用固相萃取柱进行浓缩. 柱活化条件: 6ml 乙腈, 6ml 甲醇, 6ml 超纯水. 进样速度: $3\text{--}5\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. 洗脱条件: 8ml 的乙腈和二氯甲烷混合溶液 (体积比 1:1). 洗脱液在微弱氮气下吹干, 用甲醇定容至 1ml. 标准添加各对象物质 $0.1\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ 于自来水, 用固相萃取柱浓缩, 回收率都高于 80%.

2002 年 6 月 25 日收稿.

1) 国家杰出青年科学基金项目 (49925103), 环保“863”(2001AA646010-5). 2) 东北大学理学院, 3) 浙江省城市供水水质监测中心.

1.3 LC-MS 分析

采用日本资生堂产 C18 (2.0mm I.D. \times 150mm \times 3 μ m) 色谱柱进行分离. 对象物质的分离采用梯度淋洗, 流动相条件分三种: (1) 在 25min 内乙腈从 0% 线性变化到 100%; (2) 在 16min 内从 10% 甲醇和 90% 水线性变化到 50% 乙腈和 50% 甲醇, 保持 4min 不变; (3) 在 25min 内甲醇从 0% 凸型变化到 100%. 流速为 0.2ml min^{-1} , 进样量为 20 μ l.

质谱条件: 去溶剂气流量 500L h^{-1} , 去溶剂温度 400, 锥孔气流量 100L h^{-1} , 离子源的温度 130, 喷雾毛细管电压 2.5kV.

2 结果与讨论

2.1 各对象物质的质谱图

LC-MS 质谱上的基准离子峰经常是分子离子峰. 改变离子源的锥孔电压, 可以获得与结构信息有关的碎片离子. 一般锥孔电压愈高, 碎片离子就愈多. 锥孔电压在 E1 (76V), E2 (90V), E3 (89V), EE (80V) 时, 质谱图上除了分子离子峰以外, 还观察到了离子强度和分子离子峰相似的 m/z 145.2 的碎片离子. 除了 m/z 145.2 以外, 还观测到强度相对较弱的其它碎片离子, 有利于实际样品中对对象物质的定性分析.

另一方面, 锥孔电压除了影响质谱图外, 还影响测定的灵敏度. 锥孔电压从 10V 增加到 70V, 4 种对象物质在不同锥孔电压下的响应曲线如图 1 所示. 从图 1 可知, 各对象物质在最大灵敏度响应时的锥孔电压有很大不同, 获得最高灵敏度时的锥孔电压分别为 E1 (50V), E2 (60V), E3 (60V), EE (50V).

上述结果表明, 根据不同的分析目的和分析对象应该选择不同的锥孔电压.

2.2 色谱分离及定量

图 2(a) 为 4 种化合物标准混合物的 LC-MS 色谱图, 色谱柱为 C18, 流动相乙腈/水, 和文献[6]相似, 在合适的流动相条件下, C18 能很好地分离各种对象物质, 其检出下限为: E1 330ng \cdot l $^{-1}$ (S/N = 6, 以下同), E2 330ng \cdot l $^{-1}$, E3 330 ng \cdot l $^{-1}$, EE 750ng \cdot l $^{-1}$. 当流动相为甲醇和水时, 各物质的灵敏度有很大提高, 检出下限分别降低到 E1 100ng \cdot l $^{-1}$, E2 50ng \cdot l $^{-1}$, E3 100ng \cdot l $^{-1}$, EE 100ng \cdot l $^{-1}$. 在这样的流动相情况下, 虽然灵敏度有了很大的提高, 但无法分离 E1, E2 和 EE 这三种物质 (如图 2(c) 所示). 因此, 流动相改变为乙腈/甲醇/水, 从图 3(b) 可以发现, E2 和 EE, E1 完全分离, E1 和 EE 有一定程度上的分离. 其检测下限分别为: E1 100ng \cdot l $^{-1}$, E2 100ng \cdot l $^{-1}$, E3 100 ng \cdot l $^{-1}$, EE 100ng \cdot l $^{-1}$, 除了 E2 以外, 其它的灵敏度和采用甲醇/水流动相时几乎相当.

2.3 实际样品的检测

对杭州地区水系中 8 个采样点的对象物质进行了调查. 采用乙腈/水作为流动相, 从色谱图上看, 虽然 EE 周围的干扰峰较少, 但是信号相对较弱, 灵敏度较低; 当采用

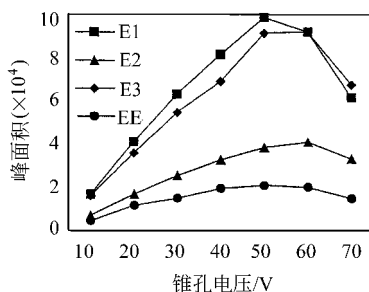


图 1 分析物质锥孔电压对灵敏度的影响

Fig. 1 Effects of cone voltage on sensitivity of analytes

甲醇/水作为流动相时,灵敏度较高,图3(a)为采样点三堡的雌激素 LC-ESI-MS 色谱图.为了确定此峰是 EE,锥孔电压从 50V 改变到 80V,对分子离子峰 m/z 295 和碎片离子峰 m/z 145 进行同时检测.结果如图3(b)和(c)所示,两种特征离子峰同时出现在保留时间 17.93min 处,和标准样品色谱图上的保留时间相吻合,从而证明此峰为 EE.

各监测点的检测结果如表1所示.在被检测的8个样品中,7个都检测出了 EE,其浓度范围在 $1.17 \sim 3.35 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间.其中在钱塘江大桥处还检测出了 E2,其浓度为 $0.32 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$.

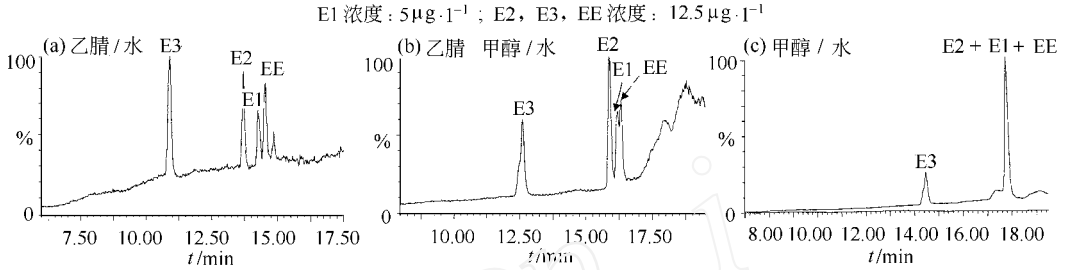


图2 分析物的 LC-ESI-MS 色谱图

Fig. 2 SIR LC-MS chromatogram of standard solution

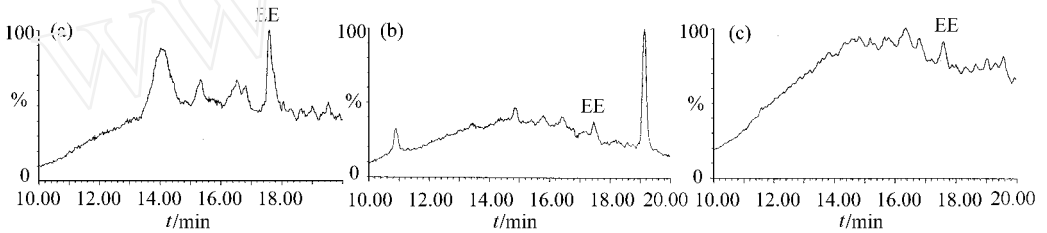


图3 环境样品中 EE 的 SIR LC-MS 色谱图

(a) 选择离子为 m/z 295, 锥孔电压为 50V; (b) 和 (c) 选择离子分别为 m/z 145 和 m/z 295, 锥孔电压为 80V

Fig. 3 SIR LC-MS chromatogram of EE in environmental sample

表1 河水中雌激素物质的检测浓度 ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

Table 1 Concentrations of estrogens in rivers ($\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$)

采样点	苕溪	贴沙河	三堡	南星桥	钱塘江大桥	九溪	浦阳江	富春江
E2	ND	ND	ND	ND	0.32	ND	ND	ND
E1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
E3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EE	ND	1.17	2.75	2.42	3.04	3.35	2.96	3.30

ND: 未检出.

3 结论

(1) 流动相对灵敏度的影响较大,甲醇/水作为流动相时的灵敏度高于乙腈/水.

(2) 在所检测的8个水样中,7个检测出了 EE,其浓度范围在 $1.17 \sim 3.35 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间,只有1个水样中检测出了 E2,其浓度为 $0.32 \text{ ng} \cdot \text{l}^{-1}$.

参 考 文 献

- [1] Routledge E J , Sheahan D , Desbrow C et al . , Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In vivo Responses in Trout and Roach. *Environ. Sci. Technol.* , 1998 , **32** 1559 —1565
- [2] Purdom C E , Hardiman P A , Bye V J et al . , Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chem. Ecol.* , 1994 , **8** 275 —285
- [3] Hansen P D , Dizer H , Hook B et al . , Vitellogenin a Biomarker for Endocrine Disruptors. *Trends Anal. Chem.* , 1998 , **17** 448 —451
- [4] Holger M Kuch , Karlheinz Ballschmiter , Determination of Endocrine-Disrupting Phenolic Compounds and Estrogens in Surface and Drinking Water by HRGC²-(NCI)-MS in the Picogram Per Liter Range. *Environ. Sci. Technol.* , 2001 , **35** (15) 3201 —3206
- [5] Johnson A C , Belfroid A , Di Garcia A , Estimating Steroid Oestrogen Inputs into Activated Sludge Treatment Works and Observations on Their Removal from the Effluent. *Sci. Total Environ.* , 2000 , **256** (2—3) 163 —173
- [6] López de Alda M J , Barceló D , Determination of Steroid Sex Hormones and Related Synthetic Compounds Considered as Endocrine Disruptors in Water by Liquid Chromatography-diode Array Detection-mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* , 2000 , **892** 391 —406

DETERMINATION OF TRACE ESTROGENS IN SURFACE WATER USING SPE-LC-MS

CHANG Hong HU Jianying SHAO Bing XU Ye¹⁾
GAO Jianfeng²⁾ DONG Mirqiang²⁾

(Department of Urban and Environmental Sciences , Peking University , Beijing , 100871)

ABSTRACT

In this study , ESFLC-MS method was used to analyze 4 estrogens (estrone (E1) , 17 - estradiol (E2) , estriol (E3) , ethynyl estradiol (EE)) in surface water , and the effects of mobile phase on the sensitivities of 4 estrogens was investigated. When CH₃CN/ H₂O , CH₃CN/ CH₃OH/ H₂O , CH₃OH/ H₂O were used as mobile phase , the limits of detection were 330—750 ng l⁻¹ , 100—300ng ·l⁻¹ , 50—100ng ·l⁻¹ , respectively. On the other hand , CH₃CN/ H₂O , CH₃CN/ CH₃OH/ H₂O can separate 4 objective compounds , while the E1 , E2 and E2 can not be separated completely when CH₃OH/ H₂O was used as mobile phase. Finally , the method based on the off-line solid-phase extraction (SPE) and ESFLC-MS was applied to analyze the four estrogens in surface water which were taken from Hangzhou river basin. The EE was detected in 7 samples , and its concentration ranged from 1.17 to 3.35ng l⁻¹. E1 and E3 were not detected in all sample , and E₂ (0.32ng l⁻¹) was found in only one sample.

Key words : estrogen , ESFLC-MS , endocrine disruptor.

1) Science Institute , Northeast University. 2) Hangzhou Municipal Water Works General Co.