

文章编号 :0253-2468(2004)01-0150-04

中图分类号 :X832

文献标识码 :A

天津野生鲫鱼体内壬基酚聚氧乙烯醚和壬基酚监测

金 芬^{1,2},胡建英^{1*},邵 兵¹,杨 敏³,陈淑桂² (1. 北京大学环境学院,北京 100871; 2. 吉林大学化学学院,长春 130026;3. 中国科学院生态环境研究中心,环境水质学国家重点实验室,北京 100085)

摘要:采用 GCB 固相萃取作为净化方法,利用 LC-ESI-MS 技术测定鱼体内不同聚合度壬基酚聚氧乙烯醚(NPnEO, $n = 3$);用 GC-MS 技术测定 NP 和 NPnEO($n < 3$). 此方法与传统的氧化铝法相比较,GCB 固相萃取作为净化方法的回收率较高,不同聚合度的 NPnEO 回收率为 70.4%—120%;方法检测限为 1 ng/g. 用此方法调查了北京排污河中鲫鱼体内的 NPnEO 的残留情况,在所捕获的 12 条鲫鱼中均检出了不同浓度的 NPnEO 和 NP. NPnEO 在北京排污河天津段鱼体内的残留浓度为 40—680 ng/g, NP 的浓度在 30—1510 ng/g,和水体中浓度之间的比值分别为 898 和 94 倍.

关键词:液相色谱-质谱;壬基酚聚氧乙烯醚;内分泌干扰物质;GCB 固相萃取

Determination of nonylphenol ethoxylate and nonylphenol in wild *Carassius auratus* from Tianjin

JIN Fen^{1,2}, HU Jianying^{1*}, SHAO Bing¹, YANG Min³, CHEN Shugui² (1. College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871; 2. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130026; 3. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085)

Abstract: A clean-up method based on GCB solid phase extraction was established to analyze the Nonylphenol Ethoxylates(NPnEO) and Nonylphenol(NP) in *Carassius auratus* muscle, and the recoveries of each NPnEO and NP ranged from 70.4% to 120%, which is better than that of Al_2O_3 clean-up method. The GCB-LC-ESI-MS and GCB-GC-MS methods were used to determine residual NPnEO($n = 3$), NPnEO($n < 3$) and NP in muscle of *Carassius auratus* from the Tianjin Section of the waste water discharge river of Beijing. The mean concentrations of NPnEO in muscle *Carassius auratus* ranged from 40 to 680 ng/g (wet weight), and NP were ranged from 30 to 1510 ng/g. The ratio between the concentration in *Carassius auratus* and in water for NP is 898 ng/g, which is 94 times as higher as that of NPnEO.

Key words: LC-MS; Nonylphenol Ethoxylate; endocrine disruptor; GCB solid phase extraction

壬基酚聚氧乙烯醚(NPnEO)是一种应用非常广泛的非离子表面活性剂,其代谢产物壬基酚(NP)显示出类雌激素效应.文献已经表明低剂量(10 $\mu\text{g/L}$)的 NP 就会诱导虹鳟产生雌性特异性蛋白-卵黄蛋白原,同时会导致雄性生物精巢组织的病变^[1,2].

环境中的 NP 主要来自 NPnEO 的生物降解,所以对 NP 的环境调查不能仅限于 NP 本身所带来的风险,还应该考虑到它的前驱物 NPnEO 所具有的潜在影响. Dayue Y. Shang^[3] 和 Kazuki Maruyama^[4] 等已经对河水中中和沉积物中的 NPnEO 进行了调查,发现水中的 NPnEO 的生物降解受季节性变化.但是到目前为止,环境水体中生物体内 NPnEO 的残留仅仅局限于 NP1EO 和 NP2EO 的研究,对于 NPnEO($n = 3$)还没有报道.鉴于以上背景,本文建立了活性炭(GCB)固相

收稿日期:2002-12-16;修订日期:2003-04-01

基金项目:国家杰出青年科学基金资助:49925103;环保“863”(2001AA646010-5)

作者简介:金 芬(1978—)女,硕士研究生 *通讯联系人 hujy@urban.pku.edu.cn

萃取-LC-ESI-MS 监测生物样品中的 NPhEO 的分析方法,并对北京排污河天津段处野生鲫鱼中 NPhEO 及其代谢产物 NP 的残留进行了检测。

1 实验部分

1.1 实验仪器

Waters 2690 液相色谱, Micromass ZMD 质谱检测器(电喷雾(ESI)), Masslynx 数据处理系统。

1.2 试剂、标准品及材料

NP(技术级,东京化成产品), NP9EO(东京化成产品)是由不同集合度的 NPhEO 组成(平均聚合度为 9)。超纯水(电导率为 $18.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$); 乙腈, 二氯甲烷, 甲醇都是 HPLC 级(Fisher 公司)。Supledean Carboxen 100C(CCB)固相萃取柱(500mg/6cc, Bellefonte, PA)。无水硫酸钠(分析纯)在 450 °C 下灼烧过夜, 在干燥器中存放; 中性氧化铝(300 目)在 650 °C 下灼烧过夜, 在 120 °C 下保存。

1.3 样品采集

鲫鱼(*Carassius auratus*)采自北京排污河天津段, 采样时间为 2001 年 10 月底, 鱼体长 8.5—18.0 cm, 体重在 15.78—113.31 g 之间。将活鱼带回实验室进行解剖处理后冷冻保存。

1.4 样品前处理

取 2 g 左右匀质的鱼上腹部肌肉, 用 20 g 无水 Na_2SO_4 与之一起研磨, 用二氯甲烷-甲醇混合液(体积比 70:30) 200 mL 作溶剂索氏提取 24 h, 用石墨化碳黑(GCB)固相萃取柱进行净化浓缩。活化条件: 10 mL 二氯甲烷-甲醇混合液(80:20); 10 mL 甲醇; 10 mL 水。

上样: 用甲醇-水混合液(体积比 1:10) 200 mL 溶解后, 用浓盐酸调 pH 为 2—3, 上样速度为 10—15 mL/min。洗脱条件: 10 mL 二氯甲烷-甲醇混合液(体积比 80:20)洗脱。洗脱液在缓缓氮气流下吹干, 用乙腈定容至 1.00 mL。

1.5 样品的测定

用 LC-ESI-MS 方法检测 NPhEO($n=3$), 各聚合度的 NPhEO 分离采用 50 mm \times 21 mm \times 3 μm C18 柱和 150 mm \times 21 mm \times 3 μm Waters Spherisorb SW3 正相分离柱相串联的方法, 详细方法参见文献 5。对于 NP 和短链的 NPhEO($n=1, 2$), 采用了文献 6 中的 GC-MS 法。

1.6 定性和定量

用标准样品的色谱图的保留时间对样品中的 NP 和 NPhEO 进行定性。绘制标准曲线用色谱图中提取离子峰面积与标准曲线相对应从而定量 NPhEO 的浓度。

2 结果与讨论

2.1 回收率

目前对鱼体中短链 NPhEO 的分析方法常常采用水蒸气蒸馏-层析柱法及索氏提取-层析柱法^[7,8], 层析柱所采用的填充剂为氧化铝。本文首先评价了 Al_2O_3 层析柱作为纯化方法的有效性, 在 2 g 左右的鱼肉中标准添加 0.50 mL 的 3.85 mg/L 的 NP9EO, 放置过夜, 使样品完全被鱼肉所吸收, 索氏提取 24 h 后过 5% 脱活的 Al_2O_3 层析柱, 得到的色谱图如图 1a 所示。标准添加浓度为 1.93 $\mu\text{g/g}$, 各 NPhEO 都得到了较好的分离, 但是背景相对较高。计算各 NPhEO 的回收率, 结果如表 1 所示。发现聚合度 5, 6, 15 的 NPhEO 的回收率过高, 分别为 290.0%, 202.0%, 167.6%。这一结果表示了用 Al_2O_3 不能有效的去除样品中的干扰基质, 导致这些峰受背景的

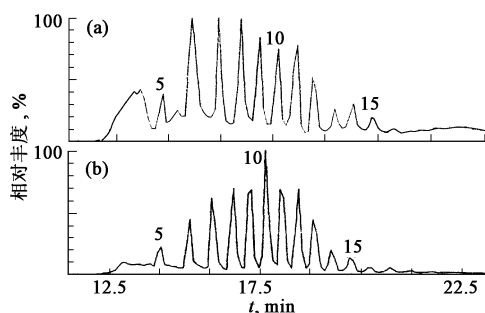


图 1 鱼体中 NP9EO 的 LC-ESI-MS 色谱图标准添加浓度为 1.93 µg/g ((a) 氧化铝净化方法 (b) GCB 固相萃取净化方法)

Fig. 1 LC-ESI-MS chromatograms of fish spiked with 1.93 µg/g NP9EO (a) Al₂O₃ clean-up (b) GCB clean-up

干扰较大;相反,聚合度为 10—12 的 NPhEO 的回收率偏低(仅为 50%左右)。

为了改善鱼体中 NPhEO 的净化回收效果,本文又尝试了用 GCB 固相萃取柱净化鱼体样品中 NP9EO 的方法.图 1b 表示了经 GCB 净化后的样品中的 NP9EO 的色谱图,加标浓度和 Al₂O₃ 法相同.由图 1b 可知,色谱图的基线有了明显的降低,特别改善了聚合度 5,6 周围的背景.各聚合度的回收率也表示在表 1 中,不同聚合度的 NPhEO 回收率在 70.4%—120% 之间,基本上满足痕量分析的要求. NP 和聚合度为 1 和 2 的 NPhEO 的测定采用了 GCB-GC-MS 法检测.除此之外,我们还对 C18 固相萃取柱的净化效果进行了实验,未得到较好的回收效果。

表 1 不同前处理方法测定鱼样中不同聚合度的 NPhEO 回收率(n=4)的比较

Table 1 Comparison of recoveries of NPhEO and NP between Al₂O₃ and GCB clean-up methods (n=4)

NPhEO	回 收 率		NPhEO	回 收 率	
	A (%) ±RSD (%)	B (%) ±RSD (%)		A (%) ±RSD (%)	B (%) ±RSD (%)
NP	96.7 ±2.3	79.5 ±3.4	NP9EO	78.8 ±7.6	107.8 ±13.9
NP1EO	88.2 ±6.0	75.4 ±7.7	NP10EO	53.9 ±5.2	70.4 ±10.0
NP2EO	90.1 ±4.6	71.3 ±9.6	NP11EO	54.8 ±18.7	106.3 ±4.7
NP3EO	151.4 ±5.2	80.0 ±6.9	NP12EO	52.5 ±20	76.2 ±9.4
NP4EO	29.2 ±10.9	95.4 ±4.1	NP13EO	76.8 ±9.1	95.3 ±14
NP5EO	290.0 ±26.9	94.1 ±6.0	NP14EO	101.4 ±12.2	98.8 ±13.2
NP6EO	202.0 ±23.2	77.5 ±13	NP15EO	167.6 ±15.3	86.7 ±15.3
NP7EO	81.8 ±18.1	91.5 ±6.2	NP16EO	64.8 ±12.5	89.1 ±14.0
NP8EO	78.6 ±3.2	78.2 ±13.4			

注:A:索氏提取-Al₂O₃层析柱法 B:索氏提取-GCB固相萃取法

鉴于 GCB 固相萃取柱不但能有效回收而且净化生物样品中的 NPhEO 的功能,本文建立了以 GCB 固相萃取柱为净化方法的 LC-ESI-MS 监测鱼体中的 NPhEO 的方法.以养殖鲤鱼为背景值,在鱼肉中加入 NP 和 NPhEO (n=1—6),确定了本方法的监测的定量下限: NP, NP1EO 和 NP2EO 分别为 8 ng/g, NP(3—6)EO 为 1 ng/g (以湿重计, S/N=10),由于其余聚合度的 NPhEO 性质比较类似,由此类推聚合度大于 6 的 NPhEO 的检出限为 1 ng/g。

2.2 鲫鱼 (*Carassius auratus*) 体内 NPhEO 的浓度分布

用上述建立的 LC-ESI-MS 方法于 2001 年 10 月底对北京排污河中捕获的 12 条鲫鱼肌肉中的 NPhEO 残留浓度进行了检测.结果每条鲫鱼中都检出了 NPhEO.图 2 表示了体长为 8.5 cm 体重

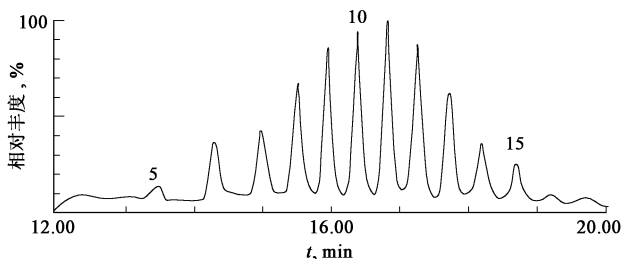


图 2 鱼体内不同聚合度的 NPhEO 的分布情况

Fig. 2 LC-ESI-MS chromatograms of NPhEO in muscle of *Carassius auratus*

为 16.96 g 的 7 号鲫鱼体内 NPhEO 的 LC-ESFMS 色谱图. 聚合度为 $n = 4 - 19$ 的 NPhEO 被检出来, 呈现高斯分布; 平均聚合度为 10, NPhEO 的总浓度为 480 ng/g. 用 GC-MS 法分析 NP 其浓度为 230 ng/g. NPhEO 的总浓度及 NP 在北京排污河天津段鲫鱼体内的残留浓度分布见表 2.

所捕获的 12 条鲫鱼肌肉中的 NPhEO 总浓度分布在 40—680 ng/g (以湿重计), 其总浓度平均值为 288 ng/g, NP 的浓度范围在 30—1510 ng/g (以湿重计), 其浓度平均值为 288 ng/g, 鲫鱼肌肉中的 NP 浓度高于 NPhEO 的浓度. 对于北京排污河河水和沉积物中的 NP 和 NPhEO 也进行了测试, 结果表明水中 NP 和 NPhEO 浓度平均值分别为 390 ng/L 和 3060 ng/L, 底泥中 NP 和 NPhEO 浓度

平均值分别为 175、390 ng/g (以干重计). 沉积物中的 NP 和 NPhEO 和水中浓度之比分别为 449 倍和 127 倍, 相对于 NPhEO 来说, NP 更容易累积在沉积物中. 计算鲫鱼肌肉中 NP, NPhEO 和水中浓度之比分别为 898 倍 (平均) 和 94 倍 (平均), NP 的比值高于 NPhEO 的比值, 和沉积物相似. 另一方面, NP 的鱼/水的比值高于沉积物/水中的比值. 但 NPhEO 的鱼/水比值略低于 NPhEO 的沉积物/水比值. 这一结果可能是由于鱼体更容易富集 NP, 或者是由于鱼体内发生 NPhEO 代谢生成 NP 造成的, 有待于进一步的研究.

3 结论

GCB 固相萃取柱能有效净化回收鱼体样品中的不同聚合度的 NPhEO, 各聚合度 NPhEO 的回收率在 70.4%—120.0% 的范围内. GCB-LC-MS 和 GCB-GC-MS 能有效的监测鱼体中 NPhEO 和 NP 的残留. 对捕获自北京排污河天津段鱼体内的 NP 和 NPhEO 的监测结果表明, NP 的浓度高于 NPhEO 总浓度, 分别为 30—1510 ng/g, 40—680 ng/g.

参考文献:

- [1] Gray M A, Metcalfe C D. Induction of Testis-Ova in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-Nonylphenol [J]. Environ Toxicol Chem, 1997, 16(5): 1082
- [2] Jobling S, Nolan M, Tyler C R, Brighty G. Widespread sexual disruption in wild fish [J]. Environ Sci Technol, 1998, 32(17): 2498
- [3] Dayue Y, Shang, Robie W, Macdonald, Michael G, Ikonomou. persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, british Columbia (Canada) [J]. Environ Sci Technol, 1999, 33(9): 1366
- [4] Kazuki Maruyama, Mucun Yuan, Akira Otsuki. Seasonal changes in Ethylene Oxide chain length of Poly (oxyethylene) Alkylphenol Ether nonionic surfactants in three main rivers in Tokyo [J]. Environ Sci Technol, 2000, 34(2): 343
- [5] Shao B, Hu J Y., Yang M. Determination of nonylphenol ethoxylates in the aquatic environment by normal phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. J Chromatogr, 2002, 950(2): 167
- [6] 邵 兵, 胡建英, 杨 敏. 重庆流域嘉陵江和长江水环境中壬基酚污染状况调查 [J]. 环境科学学报, 2002, 22(1): 12
- [7] Ahel M, Mecvy J, Gger W Gger. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in Fresh-Water Organisms [J]. Environ Pollution, 1993, 79(1-2): 243
- [8] Taizo Tsuda; Kunio Suga. Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 746(2): 305

表 2 北京排污河天津段鲫鱼体内的 NP 及 NPhEO 的浓度

Table 2 Concentrations of NP and NPhEO in muscle of *Carassius auratus* from Tianjin Section of the waste water discharge river from Beijing

ng/g			ng/g		
样品号	NP	NPhEOs	样品号	NP	NPhEOs
鲫鱼 1	480	260	鲫鱼 7	230	480
鲫鱼 2	1510	380	鲫鱼 8	120	200
鲫鱼 3	517	230	鲫鱼 9	270	120
鲫鱼 4	335	200	鲫鱼 10	30	40
鲫鱼 5	310	180	鲫鱼 11	870	680
鲫鱼 6	366	220	鲫鱼 12	380	470