

王园园, 宋晓明, 温玉娟, 等. 固相萃取 - 衍生化 - 气相色谱 - 质谱联用测定不同水体中类固醇雌激素方法研究[J]. 岩矿测试, 2017, 36(5): 519 - 528.

WANG Yuan-yuan, SONG Xiao-ming, WEN Yu-juan, et al. Determination of Steroid Estrogens in Different Water Samples Using SPE-derivatization Coupled with GC-MS[J]. Rock and Mineral Analysis, 2017, 36(5): 519 - 528.

【DOI: 10.15898/j.cnki.11-2131/td.201705310092】

## 固相萃取 - 衍生化 - 气相色谱 - 质谱联用测定不同水体中类固醇雌激素方法研究

王园园<sup>1</sup>, 宋晓明<sup>1</sup>, 温玉娟<sup>1</sup>, Muhammad Adeel<sup>1</sup>, 杨悦锁<sup>1,2\*</sup>, 宋伟<sup>3</sup>

1. 沈阳大学区域污染环境生态修复教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110044;
2. 吉林大学地下水环境与资源教育部重点实验室, 吉林 长春 130021;
3. 中国石油天然气股份有限公司吉林油田分公司新民采油厂, 吉林 松原 138001)

**摘要:** 针对地下水及地表水体样品中痕量类固醇雌激素 (SEs) 污染问题, 本文建立了固相萃取 - 衍生化 - 气相色谱 - 质谱联用 (SPE - GC - MS) 同时测定不同水体中 5 种 SEs: 雌酮 (E1)、17 $\alpha$  - 雌二醇 (17 $\alpha$  - E2)、17 $\beta$  - 雌二醇 (17 $\beta$  - E2)、17 $\alpha$  - 乙炔基雌二醇 (EE2)、雌三醇 (E3) 的分析检测方法。通过优化固相萃取过程和衍生化条件以及复杂样品的二次净化过程, 发现用 Oasis HLB 柱萃取, 用乙酸乙酯洗脱, 40 $^{\circ}$ C 条件衍生化 20 min 可以达到最佳效果, 并且经甲醇活化过的 Generik NAX 柱对复杂样品的二次净化效果较好。本方法对 E1、17 $\alpha$  - E2、17 $\beta$  - E2 和 EE2、E3 检测的线性范围分别为 5 ~ 1000 ng/L 和 10 ~ 1000 ng/L; 方法检出限和定量限分别为 2 ~ 3 ng/L 和 6.5 ~ 10 ng/L; 对水样的加标回收率范围为 80% ~ 120%; 该方法测定 SEs 峰面积的日内相对标准偏差为 6.8% ~ 10%。应用此方法对鱼塘水、河水、地下水、污水处理厂二级出水进行了 SEs 污染水平检测, 结果表明该检测技术可以有效应用于不同水质地表及地下水类固醇雌激素化学风险识别与评估。

**关键词:** 水样; 类固醇雌激素; 气相色谱 - 质谱法; 固相萃取; 衍生化

**中图分类号:** O657.63      **文献标识码:** A

水体是各种污染物传输和扩散的环境途径, 尤其地下水循环是对土壤包气带与含水层构成污染风险的重要营力。地下水中污染物的含量虽然一般比地表水低, 但是潜在健康和环境风险更高, 这给检测带来更大的挑战。环境雌激素作为一种内分泌干扰物 (EDCs), 能够进入动物或人体, 在生物体内富集, 并对机体内正常内分泌物质的合成、释放、运转、代谢以及结合等产生干扰, 从而破坏内分泌系统的正常运行<sup>[1-2]</sup>。相对于其他 EDCs, 类固醇雌激素

(SEs) 被认为具有更强的内分泌干扰性和生物活性<sup>[3-4]</sup>。在很低的浓度 (1 ng/L) 条件下, SEs 便能引起人体或动物生殖障碍、行为异常和幼体变异等<sup>[5-7]</sup>。目前, 研究人员从不同环境水体甚至饮用水中均检测到 SEs<sup>[8-10]</sup>。因此, 针对不同类型水体尤其是杂质含量高、成分复杂的地表水以及受到痕量污染的地下水中类似于 SEs 的新型污染物的可靠检测技术和方法是其化学风险评估和进一步修复工程实施的重要内容, 应当尽快开发灵敏、高效的 SEs

收稿日期: 2017 - 05 - 31; 修回日期: 2017 - 06 - 30; 接受日期: 2017 - 07 - 17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41472237, 41471409); 沈阳市科学事业费竞争性选择项目; 辽宁省创新团队项目 (LT2015017)

作者简介: 王园园, 硕士研究生, 环境科学与工程专业。E-mail: wangyuanyuan5921@qq.com。

通讯作者: 杨悦锁, 教授, 主要从事污染地下水和土壤的场地调查、污染物识别等方面研究。E-mail: yangyuesuo@jlu.edu.cn。

测试方法,对不同类型水体中的 SEs 污染化学风险进行识别和评估。

环境中典型的 SEs 主要包括动物和人体内天然存在的雌酮(E1)、17 $\beta$ -雌二醇(E2)、雌三醇(E3)和人工合成的用于口服避孕药药物的 17 $\alpha$ -乙炔基雌二醇(EE2)。SEs 的危害性比较大,尤其是 17 $\beta$ -E2 的内分泌干扰性最强<sup>[11-12]</sup>。这些 SEs 部分已经迁移进入地下水中,给人类饮用水安全造成严重威胁<sup>[13-15]</sup>。不同类型的水体中 SEs 种类多,含量通常较低,一般为  $\mu\text{g/L}$  或  $\text{ng/L}$  数量级,再加上基质效应等其他干扰因素的存在,即使使用灵敏度很高的分析仪器也难以得到准确的测试结果,因此样品分离富集前处理技术在痕量分析中尤为重要<sup>[16]</sup>。目前,针对水体样品的前处理技术主要有:①固相萃取法(SPE)<sup>[17-18]</sup>;②液液萃取(LLE)<sup>[19]</sup>;③固相微萃取(SPEA)<sup>[20-21]</sup>;④分散液液微萃取(DLLME)<sup>[22-24]</sup>。其中,固相萃取法应用最为广泛。而针对水体中 SEs 的检测方法主要有:①免疫分析法<sup>[25]</sup>:具有很好的稳定性和重现性,但是由于不同 SEs 组分具有相似的结构,免疫分析法无法对不同类型的 SEs 进行分离,只能检测单一 SEs 化合物含量或所有 SEs 总量;②IT 分子印迹技术<sup>[17,26]</sup>:该方法选择性很高,但是制备模板分子或分子印迹聚合物不适宜非专业人士操作;③同位素标注法<sup>[27]</sup>:该方法灵敏度高,定量准确、方法简便,但是同位素标记物具有放射性,对人体健康危害较大,标记化合物所需原料成本较高;④液相色谱-质谱法(LC-MS)<sup>[28-29]</sup>:可检测城市污水及地下水中以纳克级存在的低浓度 SEs,具有很高的分离性能,但是样品前处理时间较长,仪器价格昂贵;⑤气相色谱-质谱法(GC-MS)<sup>[30-32]</sup>:虽然该技术也需要足够量的样品和衍生化操作,但是灵敏度高、检测速度快、选择性好,通常被人们应用于水环境中痕量 SEs 的分析检测。

现有关利用 SPE-衍生化-GC-MS 方法检测水中类固醇雌激素的报道已有很多,但仍存在以下问题:①地表水中的 SEs 污染物因浓度高而容易被检测,而地下水中的 SEs 新型污染物因浓度低而不易被探测;前人涉及相关文献研究已经表明 SEs 的确能够由地表穿透包气带进入地下水中。但是目前的研究仍然主要集中于对河流、污水等地表水的检测,很少涉及污染物含量更低、潜在风险更高的饮用

水等地下水样检测;②对于某些成分比较复杂、含有色杂质较多的污废水以及部分地下浅水水样经 SPE 浓缩富集之后仍有不同程度的色素残留,若直接进行 GC-MS 检测,对色谱柱损害较大,可能造成色谱柱堵塞或缩短色谱柱使用寿命,以往研究很少针对这种情况提及固相萃取之后的二次净化过程;③大多数研究<sup>[32-34]</sup>中,衍生化过程时间较长,所需温度较高,导致总体衍生化效率较低。因此,针对以上问题,本研究建立的 SPE-(净化)-衍生化-GC-MS 法对包括地表水和地下水在内的不同类型水体中 SEs 污染水平进行检测,并针对固相萃取之后仍含有色素等杂质的污水增加了二次净化过程。本方法中衍生化时间相对较短,所需衍生化温度相对较低,在一定程度上提高了衍生化效率。因此,本项研究就是在有效吸收前人研究成果基础上,努力在这几个方面有所突破,为地下水资源保护和饮用水安全提供检测技术支撑。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和设备

TRACE GC Ultra-Polaris Q 型气相色谱-质谱仪(ThermoFisher 公司,美国),配 AI/AS3000 型自动进样器;DB-5MS 色谱柱(J&W Scientific 公司,美国);DP400D-2 型氮气吹扫仪(无锡德谱仪器制造有限公司,中国);Visiprep™ 大体积采样器与 24 位真空固相萃取装置(Supelco 公司,美国);固相萃取小柱(Agilent 公司,美国);Oasis HLB(Waters 公司,150mg/6cc);净化柱:Generik NAX(Sepax 公司,500mg/6cc);PB-10 型 pH 计(赛多利斯公司,德国);SQP 型电子天平(赛多利斯公司,德国)。

### 1.2 标准溶液和主要试剂

SEs 标准品(Sigma-Aldrich, 美国):E1(纯度 $\geq 99.5\%$ )、17 $\alpha$ -E2(纯度 $\geq 99.0\%$ )、17 $\beta$ -E2(纯度 $\geq 98.2\%$ )、EE2(纯度 $\geq 98.2\%$ )和 E3(纯度 $\geq 98.8\%$ );衍生化试剂 MSTFA[N-甲基-N-(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺: $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NOSi}$ ]购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

SEs 标准储备液:准确称取 E1、17- $\alpha$ E2、17- $\beta$ E2、EE2、E3、17 $\beta$ -E2-d4 标准品各 10 mg 分别溶于 10 mL 甲醇中,配制成 1.0 g/L 的 SEs 标准储备液,置于冰箱(4℃)中冷藏保存。

SEs 混合标准储备液:分别从上述各 SEs 标准

储备液中准确量取 100  $\mu\text{L}$  于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 10 mg/L 的 SEs 标准混合液,置于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。实验中根据需要稀释成所需浓度。

本实验所用有机试剂:甲醇、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷等均为色谱纯级,购自德国 Merck 公司;吡啶(科密欧公司,中国)纯度 $\geq 99.5\%$ ;本研究用水为超纯水,由美国 Millipore 公司的 Milli-Q Direct16 超纯水机制备。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 固相萃取

用 SEs 标准混合溶液与超纯水配制浓度为 200 ng/L 的溶液进行 SEs 测试方法的开发,利用野外采集的不同类型的水样进行测试方法的验证与基质效应评估。取各类型水样 1 L,过 0.45  $\mu\text{m}$  混合纤维素膜(MCE),加入内标物质 17 $\alpha$ -E2-d<sub>4</sub>,使其含量为 200 ng/L。Oasis HLB 柱活化与平衡条件为:首先用 5 mL 乙酸乙酯过柱,然后用 5 mL 甲醇浸泡 5 min,最后用 15 mL 超纯水过柱,以 1~2 mL/min 流速对柱子进行活化与平衡。将 1 L 水样利用大体积采样器以 3~5 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 柱对 SEs 进行富集。水样过柱后,用 10 mL 体积浓度 10% 的甲醇水溶液淋洗固相萃取柱,以清除柱内的杂质。将固相萃取柱真空抽干 60 min,最后用 10 mL 乙酸乙酯以 1 mL/min 的流速对目标 SEs 进行洗脱。成分复杂的样品(如:污水处理厂二级出水)洗脱液中有色杂质较多时需要进行二次净化步骤:将洗脱液利用轻柔氮气流吹干,然后加入 1 mL 甲醇重新溶解 SEs,并将其通过 Generik NAX 柱(预先用 5 mL 甲醇进行活化)进一步净化,最后利用 5 mL 甲醇洗脱。

#### 1.3.2 样品衍生化

将 SEs 标准溶液和 SPE 洗脱液经轻柔氮气流吹至近干,转移至色谱小瓶内,然后在氮气流中浓缩至干,加入 50  $\mu\text{L}$  吡啶和 100  $\mu\text{L}$  MSTFA,涡旋 30 s 后,在 40 $^{\circ}\text{C}$  条件下反应 20 min,冷却至室温后转入内衬管中进行 GC-MS 分析。

#### 1.3.3 GC-MS 分析条件

(1)GC 条件:TR5-MS 型石英毛细管色谱柱(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ );载气(纯度为 99.999% 的氦气)流量为 1 mL/min(恒流);进样方式为不分流进样;进样量为 1  $\mu\text{L}$ ;色谱柱升温程序:初始温度 50 $^{\circ}\text{C}$ ,保持 2 min;以 12 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  速率升至 260 $^{\circ}\text{C}$ ,保持 8 min;最后以 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  速率升至 280 $^{\circ}\text{C}$ ,保持 5 min。进样口温度为 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2)MS 条件:电子轰击离子源(EI),电离电压 70 eV;离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$ ,传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$ ;溶剂延迟时间 15 min;采用全扫描模式(SCAN)和选择离子扫描模式进行扫描(SIM),扫描范围为质量数  $m/z$  50~600,根据 5 种 SEs 组分的标准谱图,对每种物质选择几个丰度较强的离子作为定性和定量离子。

## 2 结果讨论

### 2.1 色谱与质谱行为

全扫描模式可以得到衍生物特征离子和保留时间用于定性分析,选择离子扫描模式可以得到色谱峰面积用于定量分析。将 5 种 SEs 组分和内标化合物 17 $\beta$ -E2-d<sub>4</sub> 的单标溶液进行衍生化后,在  $m/z$  50~600 范围内进行全扫描,得到其对应的标准谱图以及各目标 SEs 的保留时间,并选择几个相对丰

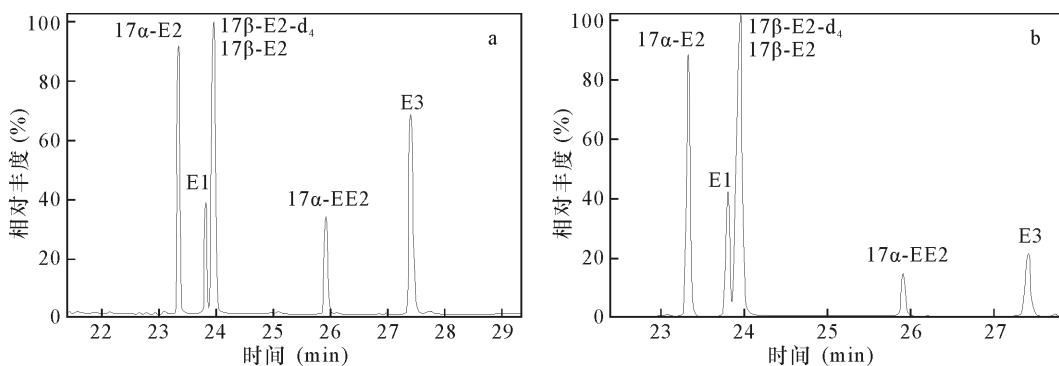


图1 目标SEs的(a)全扫描和(b)选择离子扫描总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatograms of target steroid estrogens by (a) full scan and (b) selected ion monitoring

度较强的碎片离子作为特征离子(见表1)。将特征离子中丰度最大的碎片离子作为定量离子,其他作为定性离子。然后将5种SEs组分与 $17\beta$ -E2-d<sub>4</sub>的混合标准溶液衍生化后进行扫描,得到6种SEs的总离子流色谱图,如图1a和b所示分别为全扫描模式和选择离子扫描模式下的总离子流色谱图。从图1中可以看出,通过优化升温程序后,5种SEs组分分离良好,但 $17\beta$ -E2和 $17\beta$ -E2-d<sub>4</sub>的峰相互重叠,这也与Nie等<sup>[35]</sup>、Liu等<sup>[36]</sup>等的研究结果一致。虽然二者未能实现分离,但它们的定性离子和定量离子均不相同,因此仍可以对其进行准确的区分与定量研究。

表1 目标SEs的保留时间及其特征离子

Table 1 Retention times and characteristic ions of the target steroid estrogens

化合物	保留时间 (min)	定性离子 (m/z)	定量离子 (m/z)
E1	23.24	342,218,257	342
$17\alpha$ -E2	22.81	285,326,416	285
$17\beta$ -E2	23.40	285,326,416	285
$17\beta$ -E2-d <sub>4</sub>	23.40	285,129,416	285
EE2	25.19	425,232,285	425
E3	26.56	311,386	311

## 2.2 衍生化条件的选择

衍生化时间和温度会影响衍生化的效果。本研究采用MSTFA作为衍生化试剂,分别考察不同衍生化时间和衍生化温度对SEs组分的回收率影响,每组实验条件重复3次,计算平均回收率和标准偏差见表2。

根据表2测试结果可以看出,在室温20℃、不加热条件下,各SEs组分的平均回收率较低,仅为86.8%~90.7%。温度较高(80℃)时,衍生化

表2 衍生化时间和温度对目标化合物回收率的影响

Table 2 The effects of derivatization time and temperature on recoveries of the target compounds

化合物	回收率(%) ± 标准偏差(%)									
	20℃	40℃	60℃	80℃	40℃	60℃	80℃	40℃	60℃	80℃
		20 min			40 min			60 min		
E1	88.8 ± 2.8	98.4 ± 2.9	101.2 ± 3.4	101.3 ± 3.1	100.2 ± 3.7	103.1 ± 3.9	96.7 ± 5.0	105.5 ± 3.4	105.6 ± 6.1	108.1 ± 4.3
$17\alpha$ -E2	90.7 ± 2.9	98.2 ± 2.9	95.8 ± 7.0	98.2 ± 5.0	99.3 ± 3.2	99.2 ± 4.5	93.9 ± 8.6	100 ± 3.4	102.8 ± 3.6	99.1 ± 5.8
$17\beta$ -E2	90.5 ± 7.0	98.8 ± 5.0	98.1 ± 3.4	98.5 ± 2.6	96.1 ± 6.4	98.9 ± 4.5	93.8 ± 5.8	99.8 ± 4.4	103 ± 8.2	100.6 ± 3.1
EE2	86.8 ± 4.3	99.9 ± 5.2	99.8 ± 5.4	96.5 ± 8.8	101.3 ± 3.3	97 ± 7.6	95.9 ± 8.8	108 ± 4.2	100.6 ± 7.0	100.3 ± 8.4
E3	88.7 ± 6.1	102.3 ± 2.4	103.4 ± 4.1	109.5 ± 5.3	103.4 ± 2.8	111.8 ± 5.3	86.8 ± 8.4	111.8 ± 5.3	109.4 ± 4.1	109.7 ± 4.8

20 min和60 min回收率较高,而衍生化40 min回收率略微有所降低。推测该现象的原因可能是温度较高(80℃)时,初始阶段(20 min)衍生化试剂与SEs快速反应生成有利于GC-MS分析的产物,随着反应时间的推移,衍生化试剂可能与吡啶、SEs或初始阶段的衍生化产物重新反应生成不利于GC-MS分析的副产物所致。再延长反应时间,这种不利于GC-MS分析的副产物可能在高温条件下分解还原生成有利于GC-MS分析的衍生化产物。对比不同的衍生化温度可以看出,当温度为40℃时,衍生化效果较好,随着衍生化温度的升高,5种SEs的回收率无明显提高甚至出现回收率降低的情况;对比不同的衍生化时间可以看出,当时间为20 min时,各目标化合物的回收率均已达到96.5%以上,再增加衍生化时间对回收率的提高贡献不大。综合考虑5种SEs组分的回收率以及衍生化效率,发现在40℃条件下衍生化20 min可达到最佳效果。因此,本研究选择衍生化温度40℃、衍生化时间20 min作为MSTFA的最佳衍生化条件。

## 2.3 固相萃取条件的优化

### 2.3.1 固相萃取条件的改进和确证

文献[37]采用10 mL丙酮作为洗脱溶剂,对比了4种固相萃取柱(LC-18、Oasis HLB、Sep-Pak C18和ENVITM-18)对E1、E2、EE2和E3的萃取效果,结果表明,Oasis HLB对4种目标化合物的回收率最高,可以达到82.0%~94.9%,并具有良好的重现性。ENVITM-18柱对E2的回收率虽然也高于90%,但是对E1、EE2和E3的回收率较低。本研究对该文献中提到的4种固相萃取柱对比实验进行了重复和验证,得到了类似的结论。因此,选择Oasis HLB柱对水样进行固相萃取。

根据相似相溶原理,不同的洗脱溶剂由于极性

不同,对 SEs 各组分洗脱效果也有所差异,因此有必要对不同极性的洗脱溶剂进行研究。现有文献报道<sup>[32,35,37-38]</sup>中,主要用到的洗脱溶剂有丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或二氯甲烷与丙酮的混合溶液。本研究以常用的洗脱溶剂以及极性更强的甲醇,考察了 Oasis HLB 柱对加标水样中目标化合物的回收率。所用4种洗脱溶剂极性大小为:甲醇 > 丙酮 > 乙酸乙酯 > 二氯甲烷,洗脱溶剂体积均为 10 mL。结果表明,乙酸乙酯对5种目标化合物的洗脱效果最好,测试回收率为 100.3 ~ 111.5%;甲醇对5种目标化合物的洗脱效果较乙酸乙酯差,测试回收率只有 86.5% ~ 94.4%;二氯甲烷极性较弱,只对 E1 和 E2 的洗脱效果较好,而 E3 的极性强于 E1 和 E2,二氯甲烷不能将极性相对较强的 E3 充分洗脱下来,对 E3 的回收率几乎为 0,并且对 EE2 的回收率也低于 90%。丙酮对5种目标化合物的洗脱效果总体上也比较差,仅对 17 $\beta$ -E2 和 EE2 的洗脱效果相对较好,回收率分别为 107.6% 和 95.3%,对其余3种 SEs 的回收率均高于 120%,可能是由于甲醇和丙酮的极性均强于乙酸乙酯,在洗脱 SEs 各组分的同时也把部分杂质洗脱下来,不利于 GC-MS 分析,这与文献<sup>[37]</sup>中所得结论有所不同。根据本研究得到的乙酸乙酯对 SEs 的洗脱效果强于丙酮的结论,并且丙酮比乙酸乙酯对人体健康的危害更大,而对比丙酮洗脱和乙酸乙酯洗脱的实验过程,显示出丙酮在氮气流中吹干的速度较乙酸乙酯更慢,因此本研究选择乙酸乙酯作为洗脱溶剂。

### 2.3.2 含有色杂质水样的二次净化

本研究发现某污水处理厂出水和一部分地下浅水水体中含有一定量的有色杂质,经 Oasis HLB 柱固相萃取之后,样品中的有色杂质仍难以去除,若直接进行衍生化操作及 GC-MS 检测,对色谱柱损害较大,并且很可能影响测试结果的准确性。因此,本研究对比了 Silica cartridge、Florisil 和 Generik NAX

三种净化柱对含有色素等杂质的污水水样的净化效果,并通过优化活化与洗脱过程,最后发现用甲醇对 Generik NAX 净化柱进行预先活化,并用甲醇作为洗脱溶剂可以达到去除水样中有色杂质的目的。含有色杂质的水样经过 SPE、Generik NAX 柱净化后,色谱图基线噪声信号与净化前相比有所降低,并且杂峰数量也有所减少,回收率可达到 90% 以上。具体净化步骤为:将 Oasis HLB 柱 SPE 后的洗脱液利用轻柔氮气流吹干,然后加入 1 mL 甲醇重新溶解 SEs,并将其通过预先用 5 mL 甲醇进行活化过的 Generik NAX 柱进一步净化,最后利用 5 mL 甲醇洗脱。洗脱液再次经轻柔氮气流吹干后,可进行衍生化过程。含有色杂质的水样经 Generik NAX 柱净化前后色谱图对比见图 2。

### 2.4 方法线性范围、检出限和定量限

将 SEs 标准混合液稀释配制成系列浓度梯度的样品溶液,经上述优化的 SPE-衍生化-GC-MS 分析测定后,以信噪比  $S/N = 3$  所对应的被测化合物浓度作为该方法的检出限(LOD),以信噪比  $S/N = 10$  所对应的被测化合物浓度作为该方法的定量限(LOQ)。以各 SEs 组分的分子离子峰与内标物的分子离子峰的峰面积的比值  $Y$  为纵坐标,以质量浓度  $X$  (ng/L) 为横坐标进行线性回归分析,得到 5 种 SEs 组分的线性回归方程与相关系数(表 3)。由表 3 结果可知,各化合物峰面积与其质量浓度的线性相关性良好,相关系数( $R^2$ ) 大于 0.995,线性范围为 5 ~ 1000 ng/L (E1、E2) 和 10 ~ 1000 ng/L (E2、E3)。

### 2.5 地下水加标回收测试

取位于沈阳市北部的沈北新区地下水 2 份,加入混合标准溶液,使 2 份样品的加标量分别为 100 ng/L 和 500 ng/L,每份水样做三个平行样,按照本研究优化好的 SPE-GC-MS 方法进行测定,一天内重复测定 7 次,测试结果减去样品本底值后,计算各 SEs 组分的加标回收率和日内相对标准偏差

表 3 五种类固醇雌激素的线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限

Table 3 Linear equation, correlation coefficient, linear range, LOD and LOQ of five estrogens

化合物	回归方程	相关系数 ( $R^2$ )	线性范围 (ng/L)	检出限 ( $S/N = 3$ , ng/L)	定量限 ( $S/N = 10$ , ng/L)
E1	$Y = -3987.67 + 1312.43X$	0.9984	5 ~ 1000	2	6.5
17- $\alpha$ E2	$Y = -32075.1 + 1541.75X$	0.9982	5 ~ 1000	2	6.5
17- $\beta$ E2	$Y = -36461.6 + 1694.59X$	0.9981	5 ~ 1000	2	6.5
EE2	$Y = -7596.5 + 291.442X$	0.9963	10 ~ 1000	3	10
E3	$Y = -5898.03 + 425.589X$	0.9986	10 ~ 1000	3	10

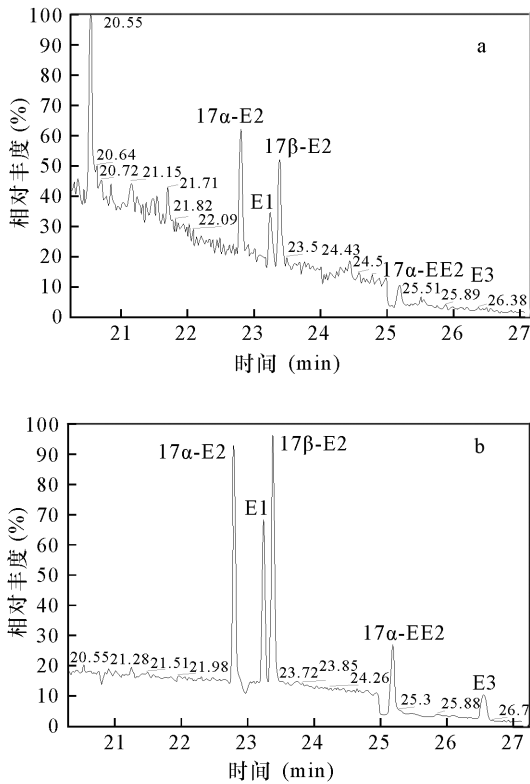


图2 含有色杂质水样经 Generik NAX 柱净化前(a)和净化后(b)的色谱图

Fig.2 The chromatograms before purification (a) and after purification (b) using Generik NAX columns

(RSD)。测试结果表明,加标浓度无论是 100 ng/L 还是 500 ng/L,地下水样中 5 种 SEs 的回收率都在 83.2% ~ 120.6%,相对标准偏差范围在 6.8% ~ 10%,基质效应较弱。因此,本研究建立的 SPE - GC - MS 测试方法具有较好的准确度与精密性,可以满足相关实际水样的分析测试要求。

### 2.6 地表水及地下水中 SEs 污染水平检测和污染源初步分析

利用本研究建立的 SEs 分析测试方法,调查了沈阳市城郊不同水体中 SEs 的分布及其浓度水平。地下水水样包括苏家屯区八一镇地下水,位于沈阳市北部的沈北新区农田地下水、居民用井水;地表水水样包括八一镇鱼塘水、苏家屯和穆家桥河水以及沈北新区某污水处理厂二级出水。由测试结果(图3)可以看出,人工合成的类固醇雌激素 EE2 在除了农田地下水水样之外的其他水样中都有检出,且浓度范围在 51.76 ~ 200.35 ng/L,远远超过 EE2 的预计无影响浓度 0.1 ng/L,说明人工合成的雌激素 EE2 对生态环境和人体健康的潜在危险性较高。鱼塘水样中 5 种 SEs

都有检出,浓度最高可达 200.35 ng/L,该浓度可能会对鱼类生长繁殖造成一定的影响<sup>[39-41]</sup>。苏家屯与穆家桥两条河水样中均未检出 17α - E2,苏家屯河水中 E1、17β - E2、EE2、E3 均有检出,浓度范围在 17.26 ~ 67.34 ng/L;穆家桥河水中只检出 EE2,并且浓度较高,达到了 193.37 ng/L,其他四种 SEs 均未检出。八一镇地下水、农田地下水以及民用井水中也检测出 SEs,可能与畜禽养殖以及粪肥使用有很大关系<sup>[42-43]</sup>。除了农田地下水外,其余地下水中的 EE2 含量较高,可能是由于农田中人口密度小,人工合成的 EE2 使用量较少,而一般乡镇居民区人口密度大,使用人工合成的 SEs 药物较多,因此地下水受到 EE2 的污染严重。污水处理厂的污水经过处理后,大部分 SEs 可以被微生物降解,但是很难被降解完全。在污水处理厂的二级出水中,17α - E2、E1、17β - E2、EE2、E3 均被检出,平均浓度为 50.9 ng/L,此分析结果对于污水处理工艺的选择以及针对典型 SEs 污染水体优化处理方式提供了依据。

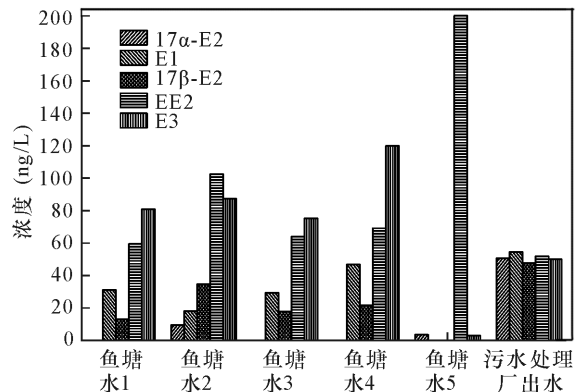
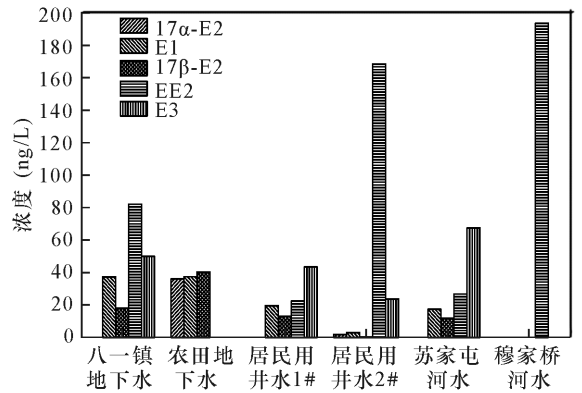


图3 不同水体中 SEs 浓度分布柱状图

Fig.3 Histograms for estrogen concentration in different water samples

### 3 结论

针对水体尤其是地下水中的新型污染物的低浓度和高毒性特点,本研究开发了利用 SPE-(净化)-衍生化-GC-MS 测试方法对不同类型水体中痕量 SEs 进行有效检测,进而在进一步污染化学风险识别及评估方面具有很好的应用前景。实验室检测研究证实,通过优化固相萃取柱的类型、衍生化时间和温度,并增加优化了针对成分复杂有色杂质含量高的污水二次净化过程,另外用乙酸乙酯代替常用的丙酮作为洗脱溶剂,可以大大缩短氮气吹干的时间,提高固相萃取效率,降低有机溶剂对实验人员的健康危害;优化后的衍生化时间较短,所需温度较低,大大提高了衍生化效率。该方法的检出限、定量限、准确度和精密度等参数均能够满足不同类型实际水样的测试要求,可以为水体中痕量( $\text{ng/L}$ 级)类固醇雌激素的检测提供可靠的数据。

通过野外场地不同水体样品检测结果表明,SEs 已经对各类水体造成了比较严重的污染,尤其是地下水中 SEs 的检出对人类饮用水安全产生了威胁,应针对此类新型污染物的修复治理以及预防等方面进行深入研究。

### 4 参考文献

[1] Chowdhury R R, Charpentier P A, Ray M B. Photodegradation of  $17\beta$ -estradiol in aquatic solution under solar irradiation; Kinetics and influencing water parameters [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2011, 219: 67 - 75.

[2] Chambers K B, Casey F X, Hakk H, et al. Potential bioactivity and association of  $17\beta$ -estradiol with the dissolved and colloidal fractions of manure and soil [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 494 - 495: 58 - 64.

[3] Zheng W, Zou Y, Li X, et al. Fate of estrogen conjugate  $17\alpha$ -estradiol-3-sulfate in dairy wastewater; Comparison of aerobic and anaerobic degradation and metabolite formation [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 258 - 259: 109 - 115.

[4] Liu Z H, Lu G N, Yin H, et al. Removal of natural estrogens and their conjugates in municipal wastewater treatment plants: A critical review [J]. *Environment Science & Technology*, 2015, 49: 5288 - 5300.

[5] 都韶婷, 金崇伟, 刘越. 水体 SEs 污染现状研究进展 [J]. *环境科学*, 2013, 34(9): 3358 - 3365.

Du S T, Jin C W, Liu Y. A review on current situations of steroid estrogen in the water system [J].

*Environmental Science*, 2013, 34(9): 3358 - 3365.

[6] Sun W L, Zhou K. Adsorption of  $17\beta$ -estradiol by multi-walled carbon nanotubes in natural waters with or without aquatic colloids [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2014, 258: 185 - 193.

[7] D' Alessio M, Vasudevan D, Lichwa J, et al. Fate and transport of selected estrogen compounds in Hawaii soils; Effect of soil type and macropores [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2014, 166: 1 - 10.

[8] Combalbert S, Hernandez-raquet G. Occurrence, fate and biodegradation of estrogens in sewage and manure [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1671 - 1692.

[9] Jiang J Q, Yin Q, Zhou J L, et al. Occurrence and treatment trials of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in wastewaters [J]. *Chemosphere*, 2005, 61(4): 544 - 550.

[10] Shrestha S L, Casey F X, Hakk H, et al. Fate and transformation of an estrogen conjugate and its metabolites in agricultural soils [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46: 11047 - 11053.

[11] Bai X L, Shrestha S L, Francis X M, et al. Modeling coupled sorption and transformation of  $17\beta$ -estradiol-17-sulfate in soil-water systems [J]. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2014, 168: 17 - 24.

[12] Lee J, Bartelthunt S L, Li Y, et al. Effect of  $17\beta$ -estradiol on stability and mobility of  $\text{TiO}_2$  rutile nanoparticles [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 511: 195 - 202.

[13] Goepfert N, Dror I, Berkowitz B. Fate and transport of free and conjugated estrogens during soil passage [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 206: 80 - 87.

[14] Singh R, Cabrera M L, Radcliffe D E, et al. Laccase mediated transformation of  $17\beta$ -estradiol in soil [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 197: 28 - 35.

[15] Postigo C. Synthetic organic compounds and their transformation products in groundwater; Occurrence, fate and mitigation [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 503 - 504: 32 - 47.

[16] Schuh M C, Casey F X, Hakk H, et al. Effects of field-manure applications on stratified  $17\beta$ -estradiol concentrations [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 192: 748 - 752.

[17] Lucci P, Núñez O, Galceran M T. Solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for selective extraction of natural and synthetic estrogens from aqueous samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(30): 4828 - 4833.

[18] Zheng M, Wang L, Bi Y, et al. Improved method for

- analyzing the degradation of estrogens in water by solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-ultraviolet detection [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2011, 23(4): 693 – 698.
- [19] Fredj S B, Nobbs J, Tizaoui C, et al. Removal of estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) from wastewater by liquid-liquid extraction [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2015, 262: 417 – 426.
- [20] Naing N N, Li S F Y, Lee H K. Evaluation of graphene-based sorbent in the determination of polar environmental contaminants in water by micro-solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1427: 29 – 36.
- [21] Wang J, Chen Z, Li Z, et al. Magnetic nanoparticles based dispersive micro-solid-phase extraction as a novel technique for the determination of estrogens in pork samples [J]. *Food Chemistry*, 2016, 204: 135 – 140.
- [22] Luo S, Fang L, Wang X, et al. Determination of octylphenol and nonylphenol in aqueous sample using simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(43): 6762 – 6768.
- [23] Wang P, Xiao Y, Liu W, et al. Vortex-assisted hollow fibre liquid-phase microextraction technique combined with high performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of oestrogens in milk samples [J]. *Food Chemistry*, 2015, 172: 385 – 390.
- [24] González A, Avivar J, Cerdà V. Estrogens determination in wastewater samples by automatic in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction prior silylation and gas chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1413: 1 – 8.
- [25] Manickum T, John W. The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407(17): 4949 – 4970.
- [26] 王硕, 陈双, 方国臻, 等. 分子印迹技术在环境雌激素检测中的应用 [J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 26(6): 99 – 104.
- Wang S, Chen S, Fang G Z, et al. Determination of environmental estrogens by molecular imprinting technique [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 26(6): 99 – 104; 99 – 104.
- [27] Bai X, Casey F X, Hakk H, et al. Sorption and degradation of 17 $\beta$ -estradiol-17-sulfate in sterilized soil-water systems [J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 1322 – 1328.
- [28] Kumar V, Johnson A C, Nakada N, et al. De-conjugation behavior of conjugated estrogens in the raw sewage, activated sludge and river water [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 227 – 228: 49 – 54.
- [29] Ronan J M, Mchugh B. A sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of natural and synthetic steroid estrogens in seawater and marine biota, with a focus on proposed Water Framework Directive Environmental Quality Standards [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013, 27: 738 – 746.
- [30] Atapattu S N, Rosenfeld J M. Solid phase analytical derivatization of anthropogenic and natural phenolic estrogen mimics with pentafluoropyridine for gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218: 9135 – 9141.
- [31] 余方, 潘学军, 王彬, 等. 固相萃取-羟基衍生化-气相色谱/质谱联用测定滇池水体中酚类内分泌干扰物 [J]. *环境化学*, 2010, 29(4): 744 – 748.
- Yu F, Pan X J, Wang B, et al. Determination of phenols in surface water of Dianchi lake by solid extraction-hydroxyl derivatization-GC-MS [J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 29(4): 744 – 748.
- [32] 廖涛, 吴晓翠, 王少华, 等. 固相萃取-气相色谱/质谱联用法同时检测水体中9种环境雌激素 [J]. *分析化学*, 2013, 41(3): 422 – 426.
- Liao T, Wu X C, Wang S H, et al. Simultaneous detection of nine kinds of estrogens in water by solid phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 41(3): 422 – 426.
- [33] 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.
- Huang C, Jiang L Y, Chen J M, et al. Determination of environmental estrogens in pharmacy wastewater using solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry with derivatization [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008, 26(5): 618 – 621.
- [34] Quintana J B, Carpinteiro J, Rodríguez I, et al. Determination of natural and synthetic estrogens in water by gas chromatography with mass spectrometric detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1024: 177 – 185.
- [35] Nie Y F, Qiang Z M, Zhang H Q, et al. Determination of endocrine-disrupting chemicals in the liquid and solid phases of activated sludge by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of*



- Chromatography A,2009,1216(42):7071-7080.
- [36] Liu R,Zhou J L,Wilding A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004,1022(1):179-189.
- [37] 黄斌,潘学军,万幸,等. 固相萃取衍生化气相色谱/质谱测定水中类固醇类环境内分泌干扰物[J]. 分析化学,2011,39(4):449-454.  
Huang B, Pan X J, Wan X, et al. Simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals in water by solid phase extraction-derivatization-gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry,2011,39(4):449-454.
- [38] 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.  
Zhang H, Mao J, Sun C J, et al. Determination of environmental estrogens in urine and bed mud by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography,2003,21(5):451-455.
- [39] Delaune P B,Jr M P. 17 $\beta$ -estradiol in runoff as affected by various poultry litter application strategies [J]. Science of the Total Environment,2013,444:26-31.
- [40] Zhang H,Shi J,Liu X, et al. Occurrence and removal of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in East China [J]. Water Research,2014,58:248-257.
- [41] Bevacqua C E,Rice C P,Torrents A, et al. Steroid hormones in biosolids and poultry litter: A comparison of potential environmental inputs [J]. Science of the Total Environment,2011,409:2120-2126.
- [42] Caron E,Farenhorst A,Mcqueen R, et al. Mineralization of 17 $\beta$ -estradiol in 36 surface soils from Alberta,Canada [J]. Agriculture, Ecosystems and Environment,2010,139:534-545.
- [43] Lee B,Kullman S W,Yost E E, et al. Predicting characteristics of rainfall driven estrogen runoff and transport from swine AFO spray fields [J]. Science of the Total Environment,2015,532:571-580.

# Determination of Steroid Estrogens in Different Water Samples Using SPE-derivatization Coupled with GC-MS

WANG Yuan-yuan<sup>1</sup>, SONG Xiao-ming<sup>1</sup>, WEN Yu-juan<sup>1</sup>, Muhammad Adeel<sup>1</sup>, YANG Yue-suo<sup>1,2\*</sup>, SONG Wei<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Regional Environment and Eco-restoration (Shenyang University), Ministry of Education, Shenyang 110044, China;

2. Key Laboratory of Groundwater Environment and Resources (Jilin University), Ministry of Education, Changchun 130021, China;

3. Xinmin Oil Production Plant of Jilin Oilfield, China Petroleum and Natural Gas Co., LTD, Songyuan 138001, China)

## Highlights

- A secondary purification process is adopted in catering for complex sample detection.
- Employment of ethyl acetate elution can reduce human health's risk compared with other common chemicals.
- The developed approach is approved to be useful and cost-effective for the detection of multiple steroidal estrogen.

**Abstract:** In order to solve trace-level steroid estrogen pollution in groundwater and surface water, a SPE-GC-MS approach to determine five steroid estrogens (SEs), E1, 17 $\alpha$ -E2, 17 $\beta$ -E2, EE2 and E3, by optimizing of solid phase extraction (SPE), derivatization conditions and the secondary purification process of complex samples has been developed. The results show that Oasis HLB column, ethyl acetate elution and derivatizing at 40 $^{\circ}$ C for 20 min can achieve the best results for extraction. Moreover, the Generik NAX column activated by methyl is suitable for the secondary purification of complex samples. The linear ranges of E1, 17 $\alpha$ -E2, and 17 $\beta$ -E2 are 5 – 1000 ng/L, whereas those of EE2 and E3 are 10 – 1000 ng/L. The detection and quantitation limits are 2 – 3 ng/L and 6.5 – 10 ng/L, respectively. The standard solution added recoveries of water samples range from 80% to 120%. The relative standard deviations of daily peak areas in the SEs determination range from 6.8% to 10%. This method was used to determine the SEs pollution levels of waters from pond, river, groundwater and sewage treatment plant effluent and results show that this detection technique can be effectively applied to the identification and evaluation of estrogen risk in surface water and groundwater samples.

The detection and quantitation limits are 2 – 3 ng/L and 6.5 – 10 ng/L, respectively. The standard solution added recoveries of water samples range from 80% to 120%. The relative standard deviations of daily peak areas in the SEs determination range from 6.8% to 10%. This method was used to determine the SEs pollution levels of waters from pond, river, groundwater and sewage treatment plant effluent and results show that this detection technique can be effectively applied to the identification and evaluation of estrogen risk in surface water and groundwater samples.

**Key words:** water samples; steroid estrogens; Gas Chromatography-Mass Spectrometry; Solid Phase Extraction; derivatization

