

分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定 土壤中雌酮、雌二醇和乙炔基雌二醇

马 帅, 冯晓元, 韩 平, 戴 莹, 平 华,
李 杨, 王纪华*

(北京农业质量标准与检测技术研究中心, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京),
农产品产地环境监测北京市重点实验室, 北京 100097)

摘 要: **目的** 建立土壤中雌酮、雌二醇和乙炔基雌二醇的超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定方法。**方法** 土壤样品经乙腈提取和 PSA+C₁₈ 分散固相萃取, 采用 UPLC-MS/MS 多反应模式(MRM)进行分析测定, 流动相为甲醇/乙腈(50:50, *V/V*)和 0.1%氨水。**结果** 雌酮、雌二醇和乙炔基雌二醇在 1~200 µg/kg 范围内呈现良好线性, 相关系数(*r*²)均不低于 0.9974, 方法的检出限(*S/N*=3)分别为 0.0012、0.0036 和 0.0058 µg/kg。土壤中 10、50 和 500 µg/kg 3 个添加水平下的回收率为 82.9~103.6%, RSD 小于 7.7%。**结论** 该方法简便、快速、灵敏且节省溶剂, 适于土壤中雌激素物质的检测。

关键词: 土壤; 分散固相萃取; 超高效液相色谱串联质谱法; 雌酮; 雌二醇; 乙炔基雌二醇

Determination of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in soil by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with dispersive solid phase extraction

MA Shuai, FENG Xiao-Yuan, HAN Ping, DAI Ying, PING Hua,
LI Yang, WANG Ji-Hua*

(Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Risk Assessment Lab for Agro-products (Beijing),
Ministry of Agriculture, Beijing Municipal Key
Laboratory of Agriculture Environment Monitoring, Beijing 100097, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in soil by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Method** According to dispersive solid phase extraction method, the soil samples were extracted by acetonitrile, purified by PSA+C₁₈ and analyzed by UPLC-MS/MS under the multiple reaction monitoring (MRM) mode with methanol/acetonitrile(50:50, *V/V*) and 0.1% ammonia water as mobile phase. **Results** Good linear relationships were obtained in the concentration range of 1.0~200 µg/kg with high correlation coefficients over 0.9974, and the limits of detection and quantification for 3 kinds of estrogens were

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303075)、农业部农产品质量安全风险评估实验室(北京)开放课题项目(ZBZXKFKT201503)

Fund: Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201303075) and the Open Project of the Risk Assessment Lab for Agro-products (Beijing), Ministry of Agriculture (ZBZXKFKT201503)

*通讯作者: 王纪华, 研究员, 主要研究方向为农产品质量检测技术与信息技术的交叉与集成。E-mail: wangjh@nrcita.org.cn

*Corresponding author: WANG Ji-Hua, Professor, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing 100097, China. E-mail: wangjh@nrcita.org.cn

0.0012, 0.0036 and 0.0058 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The average recoveries ranged from 82.9% to 103.6% under the addition levels of 10, 50 and 500 $\mu\text{g/kg}$ and the relative standard deviation was below 7.7%. **Conclusion** This method is simple, rapid, sensitive and solvent saving, which is suitable for the determination of estrogens in soil samples.

KEY WORDS: soil; dispersive solid phase extraction; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; estrone; 17 β -estradiol; 17 α -ethinylestradiol

1 引言

近年来,天然及人工合成的雌激素雌酮(estrone, E1)、17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)和乙炔基雌二醇激素(17 α -ethinylestradiol, EE2)作为典型的环境内分泌干扰物已引起世界范围的广泛关注^[1]。土壤环境中90%以上天然雌激素都来自畜禽养殖排泄物^[2,3],激素类药物以及养殖业饲料中促生长剂是人工合成雌激素的主要来源。E1、E2和EE2的辛醇-水分配系数(LogKow)介于2.45~4之间,易吸附在土壤等固相介质中^[4]。动物暴露实验表明,外源雌激素进入机体后可以发挥调控作用,干扰机体内激素的合成和转运,影响生物体的生殖发育、内分泌平衡、代谢和免疫等行为^[5],在较低的浓度下(0.1 ng/L)就可能对生物体和环境造成危害^[6,7]。

土壤中的雌激素多采用仪器检测的方法,其步骤包括样品前处理和仪器分析,样品前处理技术是雌激素检测的关键。目前,土壤中雌激素的前处理方法主要包括超声提取、微波提取、基质固相分散萃取(matrix solid-phase dispersion extraction, MSPD)、加压溶剂萃取(pressurized solvent extraction, PLE)和分散固相萃取。那广水等^[8]使用超声提取法对河流入海口沉积物中的6种雌激素进行前处理;Albero等^[9]采用基质固相分散萃取气相色谱-质谱联用(MSPD-GC-MS)法测定土壤和淤泥中的雌激素;加压溶剂萃取法是目前土壤中雌激素类化合物前处理使用较多的一种方法^[10-13],Salvia等^[14]使用优化后的QuEChERS方法测定土壤中的类固醇激素。雌激素的检测方法主要有液相色谱串联质谱法和气相色谱串联质谱法。气质联用需要复杂的衍生化操作,液质联用则不需衍生化步骤且具有较高的灵敏度被广泛应用。传统的微波、超声和加速溶剂等提取方法步骤繁琐、提取时间长、耗费有机溶剂多且回收率较低。QuEChERS由化学家Anastassiadas于2003年提出,是一种快速、简单、有效和安全的前处理方法,最初

应用于农残的测定^[15]。目前,关于QuEChERS方法测定土壤中雌激素的报道较少。本实验经过比较研究,采用优化的分散固相萃取技术,建立了土壤中雌激素的QuEChERS超高效液相色谱串联质谱法(QuEChERS-UPLC-MS/MS)的多残留分析方法,以期为土壤中雌激素的监测提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ACQUITY超高效液相色谱仪-Xevo TQ三重四级杆质谱仪(美国Waters公司);高速冷冻离心机(美国Sigma公司);Milli-Q超纯水机(美国Mimpore公司);空气浴振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂);MH-3微型涡旋混匀器(上海沪西分析有限公司)。

E1、E2和EE2标准品购自Dr. Ehrenstorfer公司,用甲醇配制成1 mg/mL的标准储备液,储存于-20℃冰箱,工作液梯度稀释;乙腈、甲醇(HPLC级,美国Fisher公司);盐酸、氨水(HPLC级,美国Sigma公司);无水硫酸镁(分析纯,北京化工厂),使用前马弗炉500℃加热5 h;C₁₈吸附剂填料(40 μm ,日本YMC公司);PSA吸附剂填料(40 μm ,天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

2.2 土壤的提取和净化

土壤样品取自北京农林科学院表层土(0~20 cm),冷冻干燥,适当研磨,过60目筛。称取5 g土样置于50 mL离心管中,加入10 mL纯水和15 mL乙腈后涡旋混合;加入1.5 g NaOAc和6 g MgSO₄,立即手动摇30 s,涡旋30 s,200 r/min振荡提取20 min,5000 r/min离心5 min。

取1.5 mL上清液于2 mL离心管中,加入150 mg MgSO₄、25 mg PSA+25 mg C₁₈,涡旋混合1 min,10000 r/min离心5 min,取1 mL上清,过0.22 μm 微孔过滤膜至进样瓶,冰箱4℃条件下保存待上机测试。

2.3 UPLC-MS/MS 分析

离子源: 电喷雾电离源(ESI), 离子源温度为 150 ℃, 毛细管电压为 2.2 KV, 雾化气温度 400 ℃, 去溶剂气流量为 800 L/h, 采用负离子多反应监测(MRM)模式扫描, E1、E2 和 EE2 的质谱多反应监测主要参数见表 1。

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm ×100 mm, 1.7 μm), 柱温 40 ℃, 样品室温度 4 ℃, 进样量 5 μL, 流速为 0.3 mL/min, 流动相组成及梯度洗脱条件见表 2。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的优化

雌激素为弱极性化合物, 目前电喷雾电离(ESI)离子源为雌激素测定的主要方法, 对 E1、E2 和 EE2 在正离子和负离子模式下进行全扫描, 以选择适当的电离方式和分子离子峰。E1、E2 和 EE2 在 ESI 电离方式下, 可获得较高丰度的 [M-H]⁻ 母离子。采用子离子扫描方式对子离子进行选择, 通过优化毛细管电压、锥孔电压和碰撞能量等参数, 使每种雌激素的分子离子与特征碎片离子产生的离子对强度最佳, 将响应值最大的碎片设定为定量离子, 次级响应离子为定性离子, 具体见表 1。

表 1 目标化合物的质谱多反应监测(MRM)优化参数

Table 1 Optimized parameters of the target compounds using MS-MS with MRM mode

化合物	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
E2	3.24	271.2	145.1*,183.1	51	40, 31
EE2	3.33	295.2	145*,158.9	45	37, 33
E1	3.45	269.2	145*,143	47	36, 48

注: *为定量离子

3.2 液相色谱条件的选择

液相对不同有机相和水相进行了优化。甲醇和乙腈是常用的有机相, 乙腈为流动相可以实现 E1、E2 和 EE2 的分离, 甲醇为流动相可以提高离子化效率, 甲醇/乙腈(50:50, *V:V*)可使得 3 种化合物有效分离和电离。对 0.1%氨水、5 mmol/L 醋酸铵和纯水 3 种水相进行比较, 0.1%氨水可以提高化合物的电离获得较高的响应值。最终确定以 0.1%氨水-甲醇/乙腈(50:50, *V:V*)为流动相, 该条件下获得的雌激素总离子图见图 1。

3.3 土壤提取方法的优化

土壤中雌激素的提取包括乙腈盐析萃取和净化两步。美国标准 AOAC 中的醋酸盐缓冲液(1.5 g NaOAc 和 6 g MgSO₄)^[16]和欧洲标准 EN15562 中的柠檬酸盐缓冲液(1 g NaOCitrate、4 g MgSO₄、1 g NaCl 和 0.5 g disodium citrate sesquihydrate)^[17]是 2 种典型的缓冲液体系。研究表明醋酸盐缓冲液对土壤中有机氯农药和酚类等化合物有较高的提取效率^[18], 因此本研究选用醋酸盐缓冲液。实验对不同填料的净化效果进行比较优化(PSA:150 mg MgSO₄和 50 mg PSA; C₁₈:150 mg MgSO₄和 50 mg C₁₈; PSA+ C₁₈:150 mg MgSO₄, 25 mg PSA+25 mg C₁₈), 结果表明 PSA+C₁₈ 的净化效果最好, 回收率为 99.4%~103.6%, 相对标准偏差(RSD)为 3.1%~6.0%(见图 2)。

表 2 流动相梯度条件

Table 2 Gradient mobile phase for UPLC

时间/min	流速(mL/min)	乙腈/%	0.1%氨水/%	梯度曲线
0.0	0.3	5	95	0
1.0	0.3	20	80	6
1.5	0.3	60	40	6
4.0	0.3	75	5	6
4.1	0.3	5	95	6
5.0	0.3	5	95	6

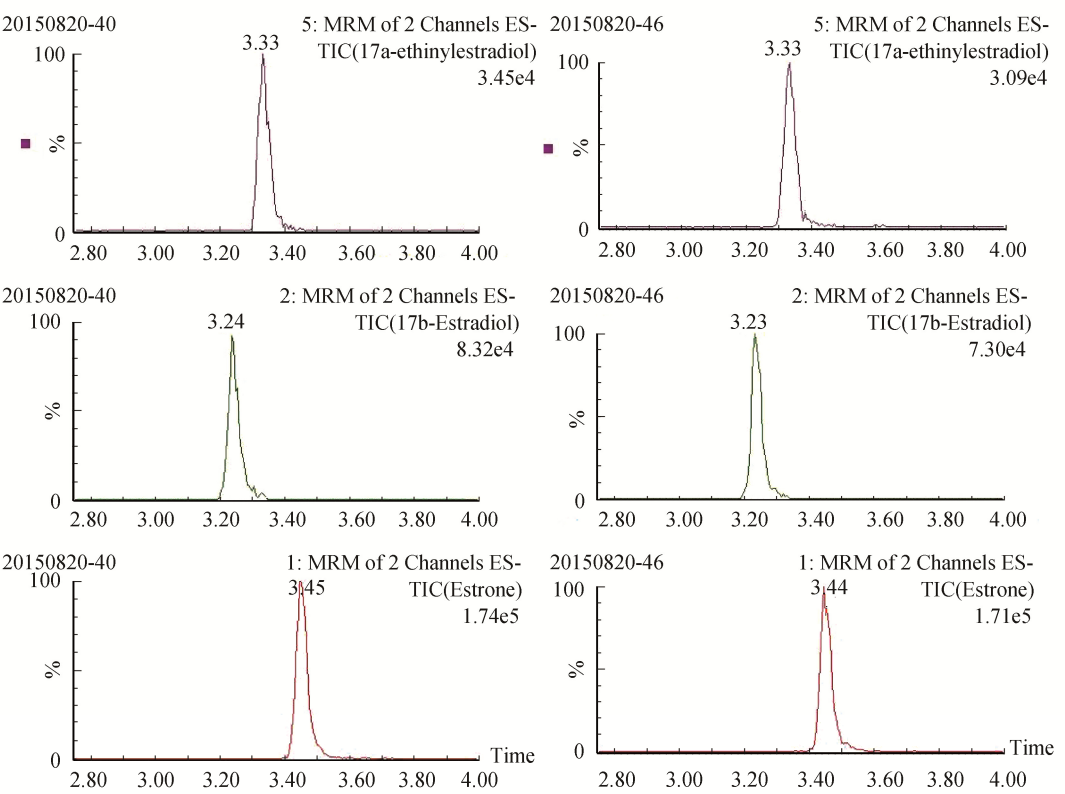


图 1 MRM 模式下 E1、E2 和 EE2 标准溶液(20150820-40)和加标样品(20150820-46)的总离子流图

Fig. 1 The total ion chromatograms in MRM mode for estrogens standard (20150820-40) and sample spiked with standards (20150820-46)

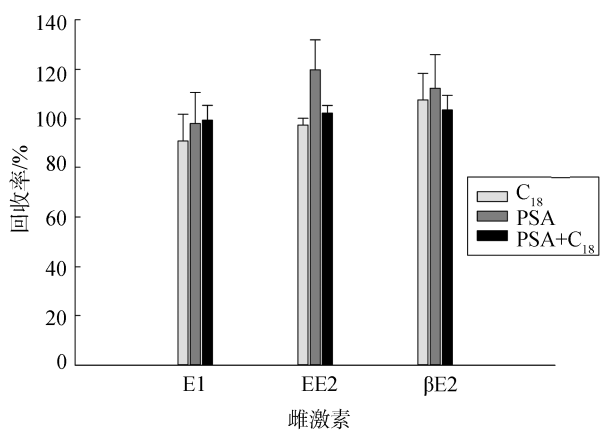


图 2 不同填料对回收率的影响($n=3$)

Fig. 2 Effect of different adsorbents on the recoveries of estrogens ($n=3$)

3.4 方法的线性范围和检出限

用空白基质配制 1~200 $\mu\text{g/kg}$ 系列 E1、E2 和 EE2 的混合标准溶液,以各组分峰面积和质量浓度绘制

标准曲线。3 种雌激素在 1~200 $\mu\text{g/kg}$ 范围内呈现良好线性关系,相关系数为 0.9974~0.9986,可以满足分析要求。以信噪比计算, E1、E2 和 EE2 的检出限 (LOD)分别为 0.0012、0.0036 和 0.0058 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.5 方法的准确度和精密度

称取 5 g 土壤样品置于 50 mL 离心管中,分别加入 0.5 mL 浓度为 100、500 和 5000 $\mu\text{g/L}$ 的甲醇混标,在涡旋混合器上混匀,静置过夜使溶剂蒸发。按照优化的方法进行加标回收率实验,每个添加水平重复测 6 次,结果表明,3 种雌激素的平均回收率为 82.9%~103.6%,相对标准偏差(RSD)为 1.7%~7.7%,精密度和准确度符合要求(见表 3)。

3.6 实际样品测定

用建立的分析方法测定了昌平和顺义设施农田土壤样品中雌激素的含量,每份样品平行测定 3 次。由表 4 可看出,5 份土壤样品中检测到雌激素,浓度范围为 1.15~10.81 $\mu\text{g/kg}$,检出率最高的是 EE2,检出率为 71.4%。

表 3 目标化合物的线性方程、相关系数、检出限、定量下限与加标回收率($n=6$)
Table 3 Linear equations, correlation coefficients (r), limits of detection (LOD), and spiked recoveries for target compounds ($n=6$)

化合物	线性方程	相关系数	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/% RSD%					
				10 $\mu\text{g/kg}$		50 $\mu\text{g/kg}$		500 $\mu\text{g/kg}$	
E2	$Y=9.11821X-4.80074$	0.9974	0.0036	96.0	7.7	103.6	5.9	102.2	4.1
EE2	$Y=6.53714X-24.4898$	0.9986	0.0058	82.9	2.7	102.3	3.1	97.3	4.0
E1	$Y=33.8766X-8.88468$	0.9975	0.0012	96.0	4.4	99.4	6.0	97.1	1.7

表 4 实际土壤样品中 3 种雌激素的含量($n=3$)
Table 4 Concentrations of 3 kinds of estrogen in soil ($n=3$)

化合物	测得值($\mu\text{g/kg}$)						
	土样 1	土样 2	土样 3	土样 4	土样 5	土样 6	土样 7
E2	1.15	3.32	ND	ND	10.81	ND	2.54
EE2	3.37	4.58	ND	5.56	9.55	ND	3.83
E1	1.86	1.26	ND	ND	7.63	ND	ND

4 结 论

本实验建立了土壤中 E1、E2 和 EE2 的分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱分析方法。土壤样品前处理采用乙腈提取和 PSA+C₁₈ 吸附填料净化, 前处理操作快速简便, 节省溶剂。采用超高效液相色谱串联质谱进行检测, 样品分析时间短, 结果灵敏度高。用所建立的方法, 对农田土壤中雌激素进行了分析检测。本方法具有简单、快速、节省溶剂、准确、灵敏度高的特点, 适用于土壤中痕量雌激素的多残留检测。

参考文献

[1] Khetan SK, Collins TJ. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry [J]. Chem Rev, 2007, 107(6): 2319–2364.

[2] Khanal SK, Xie B, Thompson ML, *et al.* Fate, transport and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems [J]. Environ Sci Technol, 2006, 40 (21): 6537–6546.

[3] 韩伟, 李艳霞, 杨明, 等. 环境雌激素的危害、来源与环境行为[J]. 生态学报, 2010, 30 (6): 1594–1603.

Han W, Li YX, Yang M, *et al.* Effects, sources and behaviors of environmental androgens [J]. Acta Ecol Sin, 2010, 30 (6): 1594–1603.

[4] 王策. EE2 的电化学降解及降解产物活性分析[D]. 哈尔滨: 哈

尔滨工业大学, 2008.

Wang C. Study on electrocatalysis of EE2 and estrogenic activity of oxidation products [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2008.

[5] Gibson R, Smith MD, Spary CJ, *et al.* Mixtures of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents [J]. Environ Sci Technol, 2005, 39(8): 2461–2471.

[6] Shappell NW, Hyndman KM, Bartell SE, *et al.* Comparative biological effects and potency of 17 α and 17 β -estradiol in fathead minnows [J]. Aquatic Toxicol, 2010, 100 (1): 1–8.

[7] Froehner S, Machado KS, Stefan E, *et al.* Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments [J]. Mar Pollut Bull, 2012, 64(1): 75–79.

[8] 那广水, 陈彤, 张月梅, 等. SPE-HPLC-MS/MS 法检测水中和沉积物中的六种甾体激素[J]. 海洋环境科学, 2011, 30 (3): 424–427.

Na GS, Chen T, Zhang YM, *et al.* Determination of six estrogens in water and sediment by SPE-HPLC-MS/MS [J]. Mar Environ Sci, 2011, 30 (3): 424–427.

[9] Albero B, Sánchez-Brunete C, Miguel E, *et al.* Analysis of natural-occurring and synthetic sexual hormones in sludge - amended soils by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography–tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2013 (1283): 39–45.

[10] Hansen M, Krogh KA, Halling-Sorensen B, *et al.* Determination of ten steroid hormones in animal waste manure and agricultural

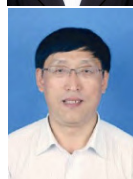
- soil using inverse and integrated clean-up pressurized liquid extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2011, 3:1087–1095.
- [11] 陈传斌, 王娜, 孔德洋, 等. 水和土壤中磺胺和激素类药物的同时分析方法[J]. *生态与农村环境学报*, 2013, 29(3): 380–385. Chen CB, Wang N, Kong DY, *et al.* Method for simultaneous determination of sulfonamides and hormone-type drugs in water and soil [J]. *J Ecol Rural Environ*, 2013, 29(3): 380–385.
- [12] Wang YH, Wang QY, Hu LF, *et al.* Occurrence of estrogens in water, sediment and biota and their ecological risk in Northern Tai hu Lake in China [J]. *Environ Geochem Health*, 2015, (37):147–156.
- [13] Tso J, Dutta S, Inamdar S, *et al.* Simultaneous analysis of free and conjugated estrogens, sulfonamides, and tetracyclines in runoff water and soils using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Agric Food Chem*, 2011, 59, 2213–2222.
- [14] Salvia MV, Vulliet E, Wiest L, *et al.* Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1245: 122–133.
- [15] Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(2): 412–431.
- [16] AOAC Official Method 200701. Pesticides residues in food by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate[Z]. AOAC International, 2007: 9.
- [17] AFNOR (NF EN 15662), Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par GC-MS et SL/SM/SM avec extraction/partition avec de l’acétonitrile et nettoyage par SPE disperses (Méthode QuEChERS) [Z]. France, 2009: 11.
- [18] Padilla-Sánchez JA, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, *et al.* Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 5724–5731.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



马 帅, 硕士, 主要研究方向为农田环境与农产品质量安全。
E-mail: mashuai19890926@126.com



王纪华, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量检测技术与信息技术的交叉与集成。
E-mail: wangjh@nercita.org.cn