

加速溶剂萃取/气相色谱质谱法测定鱼类样品中的多环麝香^{*}

胡正君 史亚利 蔡亚岐^{**}

(中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京, 100085)

摘 要 建立了鱼类样品中 5 种多环麝香的分析方法. 采用加速溶剂萃取 (ASE) 提取, 经凝胶渗透色谱 (GPC) 以及中性氧化铝层析柱净化后, 浓缩并定容洗脱液, 用 GC-MS-MS 进行检测. 本方法对替代物标样荧蒽-d₁₀ 的回收率为 92.7%—112.9%. 以六氯苯 (¹³C) 为内标, 5 种合成麝香的线性范围为 1.0—1000.0 ng g⁻¹. 麝香的检出限为 0.20—0.30 ng g⁻¹ (S/N=3). 5 种化合物的基质加标回收实验的平均回收率为 89.6%—110.1%, RSD 为 3.2%—8.8%. 方法准确, 可用于实际样品的检测.

关键词 加速溶剂萃取 (ASE), 凝胶渗透色谱 (GPC), 多环麝香, 鱼类样品, GC-MS

药品和个人护理品 (PPCP) 是一类受到国际广泛关注的新型污染物, 被称为“假持久性有机污染物”^[1]. 合成麝香 (SMs) 是 PPCP 中一类代表性的疏水性且具有持久性的污染物. 作为天然麝香的廉价替代品, 其被广泛应用于洗涤用品、香水、食物添加剂、香烟、炸药等多种日用产品、生活消费品和化学产品中^[2-3]. 由于硝基麝香逐渐被限制使用, 多环麝香逐步成为近 10 年来主要使用的合成麝香^[4]. 关于多环麝香的毒性, 有研究表明, 其在生物体内呈现毒副作用^[5-6]. 由于人类对该化合物持续性的使用, 其在环境中污染程度逐渐增加^[7]. 近年来, 多环麝香在环境中的行为、生态毒性和污染现状备受关注. 研究表明, 由于亲脂憎水性, 水中的多环麝香易生物富集进入水生生物体内^[8-9], 尤其是一些体内脂肪含量高的生物, 如鱼、虾和贝类化合物, 从而间接影响人体健康. 因此, 建立准确、快速、灵敏的鱼类样品中多环麝香的分析方法十分必要.

加速溶剂萃取法 (ASE)、凝胶渗透色谱 (GPC) 及氧化铝层析柱是目前国内外经常采用的提取、净化固体及半固体样品中有机污染物的分析方法^[10]. 我国对鱼类样品中合成麝香的研究较少, 只有胡建英等人采用索式萃取对中华鲟中的合成麝香^[11]进行了研究.

本研究采用加速溶剂萃取 (ASE) 提取, 凝胶渗透色谱 (GPC) 和中性氧化铝层析柱净化, 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 检测, 建立了鱼虾贝类中 5 种多环麝香的分析方法. 将本方法用于实际样品的检测, 效果较为理想.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

DIONEX ASE 350 型加速溶剂萃取仪 (美国 Dionex 公司); Accuprep MPS 凝胶渗透色谱仪 (美国 J2 Scientific 公司); 7890A-5975C 气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS, 美国 Agilent 公司). 佳乐麝香 (HHCB)、吐纳麝香 (AHTN)、粉檀麝香 (AHMD)、特拉斯 (ATII)、莎利麝香 (ADBI), 以及荧蒽-d₁₀ (替代物标样), 六氯苯 (¹³C) (内标), 均购自德国 Dr Ehrenstrofer 公司; 中性氧化铝 (60 目, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 使用前 450 °C 加热 4 h. 丙酮、二氯甲烷、正己烷为色谱纯; 无水 Na₂SO₄、乙醇为分析纯.

氧化铝层析柱 (由下至上): 4 g 活化的中性 Al₂O₃, 1 g 无水 Na₂SO₄.
玻璃器皿用铬酸洗液浸泡过夜, 用自来水与超纯水清洗, 烘干, 每次使用前用丙酮清洗.

2010 年 6 月 29 日收稿.

* 国家自然科学基金项目 (No. 20837003, 20921063, 20890111); 国家 973 项目子课题 (No. 2009CB421605) 资助.

* * 通讯联系人, E-mail: caiyaq@rcees.ac.cn

1.2 色谱与质谱条件

1.2.1 色谱条件

19091S-433 HP-5MS毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);升温程序:初温 90℃,保持 2 min,10℃·min⁻¹速度升至 170℃;1℃·min⁻¹升至 180℃;30℃·min⁻¹升至 270℃,保持 7 min.进样口温度 250℃,不分流进样,进样量 1 μL,载气为氦气(99%).

1.2.2 质谱条件

EI离子源,电离电压 70 eV.离子源温度:230℃,四极杆温度:150℃,传输线温度:280℃.检测方式:选择离子检测模式(SM).

利用全扫描检测模式对标准品进行定性,确定目标分析物的出峰时间、定性离子和定量离子,检测离子(m/z)见表1.虽然 ATII和 HHCB不能完全分离,但由于两种物质的特征离子不同,所以可以通过特征离子的峰面积对目标分析物进行定量.

表 1 5种多环麝香保留时间及监测离子

Table 1 Retention time, monitor ions of surrogate standard, internal standard and 5 polycyclic musks			
化合物	保留时间/min	定性离子	定量离子
ADBI	15.40	244, 173	229
AHMI	16.55	244, 187	229
HHCB	19.49	213, 258	243
AHTN	19.95	258, 148	243
ATII	19.44	258, 173	215
荧蒽-d ₁₀	26.72		212
六氯苯(¹³ C)	15.16		290

1.3 提取方法

样品冷冻干燥后,研磨混合,在使用前冷冻保存.

提取方法:34 mL ASE萃取池中装入 1g 鱼样与 35g 无水 Na₂SO₄的混合,然后加入 100 μL 100 μg·L⁻¹荧蒽-d₁₀.提取剂为正己烷.系统压力为 10.34 MPa,温度 100℃,静态提取 15 min,冲洗体积 60%,循环 2次.

净化方法:将收集液浓缩后,用 10 mL 环己烷/乙酸乙酯(1:1, V/V)定容并全部转移至凝胶渗透色谱仪的进样瓶.经 GPC净化后,收集第 35—68mL(即 7.5—14.5 min)之间的淋洗液.剩余的样品柔和氮气吹干后测脂重.

将收集的淋洗液浓缩并转换溶剂成正己烷至 0.5 mL 左右,过中性氧化铝层析柱净化.该净化柱在使用前用 5 mL 正己烷淋洗.上样后进行洗脱,洗脱条件:5 mL 正己烷,20 mL 正己烷-二氯甲烷(2:1, V/V),40 mL 正己烷-二氯甲烷(1:2, V/V).收集全部洗脱液,浓缩至近干,用正己烷定容至 1 mL,加入内标六氯苯(¹³C),用 GC-MS 测定.

2 结果与讨论

2.1 样品前处理优化

ASE提取条件优化 在 ASE 提取中,温度是影响提取效率的关键因素,本实验对比了在不同温度下,鱼类样品中多环麝香的回收率,选取 60℃, 80℃, 100℃, 120℃做对比实验.结果表明,60℃, 80℃, 100℃时,回收率相对较低,尤其是 ADBI, AHMI 和 ATII,其回收率均小于 75%.最终,确定鱼类样品中合成麝香的提取温度为 100℃.

GPC淋洗液和中性氧化铝柱条件优化 选用环己烷:乙酸乙酯(1:1, V/V)作为淋洗液,分别分析脂肪和 ADBI, AHMI, HHCB, AHTN, ATII 的流出曲线.脂肪的流出曲线由 GPC 的紫外检测器测定,多环麝香的流出曲线通过 GC/MS 分析测定.脂肪类大分子主要集中在 0—35mL 之间被淋洗出来,而 ADBI, AHMI, HHCB, AHTN, ATII 的流出在 35mL 以后,集中在 35—68 mL 之间.经多次测定,GPC 的淋洗液为 68mL,收集后 33mL.在该条件下,麝香的回收率均可达到 95% 以上.

采用梯度洗脱的方式,溶剂极性由弱至强依次进行洗脱,考察不同溶剂对多环麝香的洗脱程度.选用洗脱体系为:正己烷;正己烷-二氯甲烷(3:1,V/V);正己烷-二氯甲烷(2:1,V/V);正己烷-二氯甲烷(1:1,V/V);正己烷-二氯甲烷(1:2,V/V);正己烷-二氯甲烷(1:3,V/V);正己烷-二氯甲烷(1:4,V/V);二氯甲烷.结果表明,加入正己烷,苊蒽-d₁₀被洗脱下来;加入正己烷-二氯甲烷(2:1,V/V),AHTN被洗脱;加入正己烷-二氯甲烷(1:2,V/V),ADB1,AHM1,HHCB和ATII被洗脱.其它比例时,均未有组分被洗脱.调节各部分洗脱体积使得溶剂用量少,杂质少,回收率较高.优化的洗脱体系为:5 mL正己烷,20 mL正己烷-二氯甲烷(2:1,V/V),40 mL正己烷-二氯甲烷(1:2,V/V).

2.2 仪器线性范围、检出限及方法的回收率、精密度

在选定的最佳仪器条件下,进样1 μL对6个不同浓度的混合标准品(内标六氯苯(¹³C)),100 ng·g⁻¹进样分析,得出标准曲线及仪器检出限(S/N=3).标准曲线R²>0.999,5种多环麝香线性范围为1.0—1000.0 ng·g⁻¹.麝香的仪器检出限(LOD)在0.20—0.30 ng·g⁻¹(S/N=3)之间(表2),仪器的定量限(LOQ)按S/N=10计算.在鱼类样品中加入100 μL 100 μg·L⁻¹混合标样,做基质加标回收实验,结果表明,5种化合物平均回收率在89.6%—110.1%,精密度的3.2%—8.8%,满足实验要求.

另外,对替代物标样苊蒽-d₁₀回收情况进行了考察.经证实,使用该前处理方法,苊蒽-d₁₀回收率为92.7%—112.9%,满足实验要求.

表 2 线性方程、线性范围和相关系数				
Table 2 Regression equations, liner ranges and correlation coefficients of SMs				
化合物	回归曲线 ^a	相关系数(r)	检出限/(ng·g ⁻¹)	线性范围/(ng·g ⁻¹)
ADB1	y = 0.1538x - 0.0174	0.9997	0.20	0.6—1000.0
AHM1	y = 0.175x - 0.0159	0.9999	0.20	0.6—1000.0
HHCB	y = 0.1241x - 0.022	0.9996	0.30	1.0—1000.0
AHTN	y = 0.1241x - 0.022	0.9994	0.30	1.0—1000.0
ATII	y = 0.0238x - 0.0031	0.9997	0.30	1.0—1000.0

*: x 为分析物浓度与内标物浓度之比; y 为分析物与内标物峰面积之比.

2.3 实际样品分析

采用优化的样品前处理方法和分析条件,对白洋淀某鱼样进行分析测定.结果表明,其中主要含有HHCB和AHTN两种多环麝香,其它多环麝香均未检测到.此结果与国内外其它文献中报道相一致,且与其它介质中多环麝香的污染现状也基本一致.这与HHCB和AHTN在我国的广泛使用有关.在此鱼样中,HHCB和AHTN的浓度分别为261.3 ng·g⁻¹和27.35 ng·g⁻¹脂重(图1).与Schmid等人^[8]报道的阿尔卑斯湖泊中的鱼类样品浓度类似(HHCB,42—230 ng·g⁻¹脂重;AHTN,20—54 ng·g⁻¹脂重),稍微高于胡建英等人^[11]报道的我国中华鲟中的麝香浓度,这可能与鱼的种类和其生活环境以及其它因素有关.

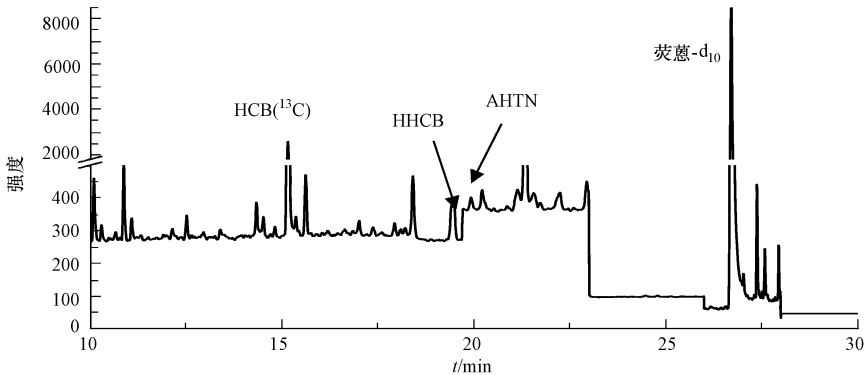


图 1 鱼样实际样品谱图

Fig 1 Chromatogram of synthetic musk fragrances in fish samples

3 结论

综上所述,本方法采用加速溶剂萃取(ASE)提取鱼类样品中的多环麝香后,利用GPC柱去除鱼类

样品中脂肪,再经中性氧化铝层析柱净化,通过 GC-MS测定,内标法定量分析了鱼类样品中 5种多环麝香.该方法具有良好的线性、精密度和准确度,杂质干扰小,适用于鱼类样品中合成麝香的分析.

参 考 文 献

- [1] Matamoros V, Bayona JM. Elimination of pharmaceuticals and personal care products in subsurface flow constructed Wetland[J]. Environ Sci Technol. 2006, 40: 5811-5816
- [2] 曾祥英,陈多宏,桂红艳,等.环境中合成麝香污染物的研究进展[J]. 环境监测管理技术, 2006 18(3): 7-10
- [3] Berset JD, Kupper T, Etter R, et al. Considerations about the enantioselective transformation of polycyclic musks in wastewater treated wastewater and sewage sludge and analysis of their fate in a sequencing batch reactor plant[J]. Chemosphere, 2004 57(8): 987-996
- [4] Sumner N R, Guitart C, Fuentes G, et al. Inputs and distributions of synthetic musk fragrances in an estuarine and coastal environment: a case study. [J]. Environ Pollut. 2009 158(1): 215-222
- [5] Toivanen N, Toimela T, Tähti H. Effect of polycyclic musks on the aromatase activity in JEG-3 chorion carcinoma cells[J]. Toxicol Lett. 2008 180(Suppl 1): S118-S118
- [6] Yanouchi R, Ishibashi H, Hirano M, et al. Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor α and vitellogenin, pregnane X receptor and cytochrome P450 3A gene expression in the livers of male medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquat Toxicol. 2008 90(4): 261-268
- [7] 梁高峰,王琨,周静,等.气相色谱-质谱联用测定母乳中合成麝香[J]. 环境化学, 2010 29(1): 113-116
- [8] Schmid P, Kohler M, Gujer E, et al. Persistent organic pollutants: brominated flame retardants and synthetic musks in fish from remote Alpine lakes in Switzerland[J]. Chemosphere, 2007 67(9): S16-S21
- [9] Gatemann R, Biselli S, Hühnefuss H, et al. Synthetic musks in the environment. Part 2: Enantioselective transformation of the polycyclic musk fragrances HHCB, AHTN, AHDJ and ATII in freshwater fish[J]. Arch Environ Contam Toxicol. 2002 42(4): 447-453
- [10] 桑文静,周雪飞,张亚雷.城市污水厂污泥中合成麝香分析方法的研究进展[J]. 中国给水排水, 2009 25(8): 17-21
- [11] Wan Y, Wei Q, Hu J, et al. Levels, tissue distribution, and age-related accumulation of synthetic musk fragrances in Chinese Sturgeon (*Acipenser sinensis*): comparison to organochlorines[J]. Environ Sci Technol. 2007 41(2): 424-430

DETERMINATION OF POLYCYCLIC MUSKS IN FISH SAMPLES BY ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE) AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

HU Zhengjun SHI Yali CAI Yaqi

(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicity, Research Center for Eco-Environmental Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

ABSTRACT

An accelerated solvent extraction (ASE) method has been developed to determine five polycyclic musk fragrances in fish samples by GC-MS. Fish samples were extracted by *n*-hexane, cleaned up by gel permeation chromatography (GPC) and activated neutral Al_2O_3 column. The final elute was concentrated with nitrogen before injection. Identification was carried out by GC-MS selective ion monitor (SIM) mode. The recovery of fluorethene- d_{10} , surrogate standard, was from 92.7% to 112.9%. The limits of detection were from 0.20 to 0.30 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ($S/N = 3$). Using hexachlorobenzene (HCB) $^{13}\text{C}_6$ as the internal standard, the calibration curves were linear between the concentrations from 1.0 to 1000.0 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$. The accuracy of the method was evaluated by recovery measurements on spiked samples, and good recoveries (89.6%—110.1%) with low relative standard deviations from 3.2% to 8.8% were achieved when spiked with 100 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ standards. The method is accurate during the inspection of synthetic musks in fish samples.

Keywords accelerated solvent extraction (ASE), polycyclic musks, gel permeation chromatography (GPC), fish, gas chromatography-mass spectrometry