

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00598

雌激素类内分泌干扰物的液相色谱-质谱分析样品前处理方法

严 炜¹ 林金明^{* 2}¹(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)²(清华大学化学系,北京 100085)

摘 要 本文对液相色谱-质谱分析过程中雌激素的样品前处理方法进行论述,内容涉及环境雌激素的样品前处理方法和近年来的应用。引用文献 77 篇。

关键词 雌激素;样品前处理;液相色谱-质谱;综述

1 引 言

环境内分泌干扰物(Environmental endocrine disrupting chemicals, EDCs)是一类能够紊乱生物体正常内分泌功能的化合物,通常在环境中它们浓度极低,且急性毒性很弱,起初并未引起人们的重视。直到 20 世纪 80 年代,在英国的河流中发现一些畸形鱼,经研究证明这种致畸作用是由于河流中的多氯联苯(PCBs)、有机锡和一些杀虫剂的雌激素效应造成的。至此,人们开始关注这些具有模拟雌二醇产生雌激素或雌性作用的天然或人工合成的 EDCs。

1996 年 12 月,欧盟首次就内分泌干扰物对人类健康和野生动物的影响开展讨论^[1],并将内分泌干扰物分为 5 大类:(1)有机卤代化合物(如二噁英、多氯联苯等);(2)双酚 A、邻苯二甲酸酯、烷基酚类;(3)类固醇类雌激素;(4)杀虫剂;(5)植物雌激素。其中类固醇类雌激素作为雌激素生物活性最强的一类内分泌干扰物而成为了研究的重点。本文就雌激素及其样品前处理方法的进展等进行了详细的综述。

2 雌激素的种类、结构和来源分布

雌激素是一类亲脂、低分子量、高生物活性的有机化合物,大致可分为天然(内源)雌激素和人工合成(外源)雌激素两类。天然雌激素(也被称为 C₁₈ 内固醇雌激素)主要包括雌酮(Estrone, E₁)、雌二醇(17β-estradiol, E₂)和雌三醇(Estriol, E₃)等。它们具有相同的四环分子结构(表 1):一个酚基团,两个环己烷基团和一个环戊烷基团,即 6-6-6-5 结构。所不同的是 D-环上 C16 和 C17 所接的官能团、位置及其立体化学排列的差异^[2]。天然雌激素因其环状结构而呈现出较强的脂溶性。但是在生物体内经过代谢作用,自由雌激素会通过酯化反应在 C3 和 C17 位结合葡萄糖苷(GLU)或硫酸盐(SUL)形成结合态雌激素。此外,雌激素在体内的各种代谢酶的作用下,还会产生一系列的羟基化和甲氧基化等反应。

环境中天然雌激素绝大部分来源于人类和牲畜的排泄物。文献报道,孕妇、经期妇女、更年期妇女和男性的雌酮排量分别为 550 μg/d^[3], 11.7 μg/d^[4], 1.4~8.5 μg/d^[5]和 2.8~3.9 μg/d^[6,7]。而对应的雌二醇排放量分别为 340~445 μg/d^[8], 1.7~4.6 μg/d^[9], 0.0~3.5 μg/d^[10]和 1.3~2.4 μg/d^[11]。此外,在畜牧业中,为了调控牲畜行为、催肥等目的,大量的雌激素添加到饲料或直接被牲畜服用,再通过粪便或尿液的排泄进入到环境中。Maier 等^[12]报道环境中 90% 的雌激素总含量来自于牲畜的排泄。Lange 等^[13]报道美国每年由牛、猪和鸡排泄的雌激素总量分别为 45、0.8 和 2.7 μg,而中国的相关报道较少。

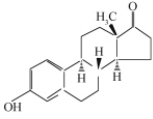
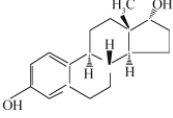
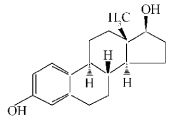
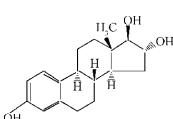
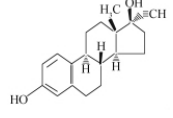
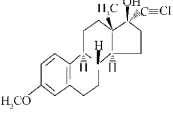
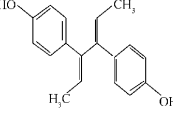
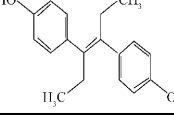
2009-06-25 收稿;2009-12-07 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20728505)和教育部高等学校博士点基金(No. 20070003026)资助

* E-mail: jmlin@mail.tsinghua.edu.cn

表 1 主要雌激素的化学结构及在环境中的主要结合方式

Table 1 Chemical structure of main estrogens and their conjugated formats

雌激素 Estrogens	缩写 Abbreviation	化学结构 Structure	主要结合方式 Main conjugated formats
天然雌激素 Natural estrogens			
雌酮 Estrone	E ₁		雌酮-3-硫酸盐 Estrone-3-sulfate 雌酮-3-葡萄糖苷酸盐 Estrone-3-glucuronide
17 α -雌二醇 17 α -estradiol	17 α E ₂		雌二醇-3-硫酸盐 Estradiol-3-sulfate 雌二醇-3-葡萄糖苷酸盐 Estrone-3-glucuronide 雌二醇-17-硫酸盐 Estradiol-17-sulfate 雌二醇-17-葡萄糖苷酸盐 Estradiol-17-glucuronide
17 β -雌二醇 17 β -Estradiol	17 β E ₂		雌二醇-3-硫酸盐-17-葡萄糖苷酸盐 Estradiol-3-sulfate-17-glucuronide 雌二醇-3-葡萄糖苷酸盐-17-硫酸盐 Estradiol-3-glucuronide-17-sulfate 雌二醇-3, 17-二硫酸盐 Estradiol-3, 17-disulfate 雌二醇-3, 17-葡萄糖苷酸盐 Estradiol-3, 17-diglucuronide
雌三醇 Estril	E ₃		雌三醇-3-葡萄糖苷酸盐 Estril-3-glucuronide 雌三醇-16-葡萄糖苷酸盐 Estril-16-glucuronide 雌三醇-16-葡萄糖苷酸盐 Estril-17-glucuronide 雌三醇-3, 17-二硫酸盐 Estril-3, 17-disulphate 雌三醇-3-硫酸盐-17-葡萄糖苷酸盐 Estril-3-sulfate-17-glucuronide
人工合成雌激素 Synthetic estrogens			
乙炔雌醇 Ethinylestradiol 1	EE ₂		乙炔雌醇-3-葡萄糖苷酸盐 Ethinylestradiol-3-glucuronide
炔雌醇甲醚 Mestranol	MES		
双烯雌酚 Dieneestrol	DIE		
乙烯雌酚 Diethylstilbestrol	DES		

至于人工合成的雌激素,如双烯雌酚(DIE),乙炔雌二醇(EE₂)和己烯雌酚(DES)等,它们均用于经期综合症、荷尔蒙补充等方面的治疗或作为避孕药的主要成分。因此,这类雌激素多来源于人类服用药物后的排泄或者过期、废弃药物的随意丢弃而进入环境中。

雌激素进入环境后,在极低浓度下(ng/L)就能诱导不同鱼体内(包括雄鱼、雌鱼和幼鱼)生成雌性特有的卵黄前体-卵黄蛋白原(VTG)和鱼卵黄膜或透明带蛋白(Zrp)。这些蛋白均是在卵生脊椎动物在17 β -雌二醇的刺激下在肝内生成。尽管到目前为止,因雌激素诱导鱼类产生异常高的VTG对鱼类的繁殖和整体健康会带来什么样的后果尚未明确,但是当前大量的实验已证明,诱导产生的VTG与许多鱼体生理变化或病变密切相关,包括虹鳟鱼的睾丸发育异常,产卵量减少,肾和肝脏的损伤等。

3 雌激素的样品前处理及液相色谱-质谱分析技术

目前,对实际样品的雌激素检测仍存在着许多困难与挑战。首先,雌激素一般存在于复杂基质中,例如河水、生活污水、底泥等,如果未经有效的净化处理,这些基质会对目标物的分析产生巨大的干扰。其次,雌激素在环境水体、尿液、血液中的含量非常低,通常浓度低于ng/L级。再次,与雌激素本身性质有关。雌激素在环境水体中有很多存在形式,包括自由态、在不同位点结合不同官能团(主要为葡萄糖苷

酸和硫酸盐)以及各种各样的代谢物形式,这无疑进一步降低了雌激素的检出浓度,加大了检测难度。

目前,检测雌激素的主要方法有免疫测定法、LC、LC-MS 和 GC-MS 等。免疫测定法广泛应用于生物基质的雌激素检测中,因为该方法满足临床分析的高灵敏度和高通量的要求。但是由于雌激素具有相似的结构,免疫检测法无法区分且容易产生交叉反应。GC-MS 的选择性和灵敏度均佳,能够区分单个雌激素。但是雌激素及其代谢物是一类小分子量、低挥发、弱极性的类固醇荷尔蒙,尽管对热稳定,但本身不易挥发,所以无法直接通过 GC-MS 分析检测,而需要对雌激素进行复杂的水解和衍生,大大增加了实验难度。另外,雌激素本身的可供离子化的官能团不多,对质谱响应信号较弱,所以目前最先进的 LC-MS 也无法实现直接检测。建立快速有效的样品前处理方法是成功检测雌激素的关键。

3.1 离线样品前处理及 LC-MS 分析

3.1.1 固相萃取 (Solid phase extraction, SPE) 固相萃取是当今样品前处理方法特别是对水体样品富集净化有机目标物,使用最为广泛的前处理方法,尤其是其对目标物广谱的适用性和多样可选的固相介质使其非常适用于后续的 LC-MS 分析。该方法通常应用于液体样品的富集净化处理中。该方法的步骤如下:在处理前样品过 0.45 或 0.22 μm 的滤膜除去悬浮杂质,然后将样品导入萃取柱或萃取盘^[14]中,常用的萃取吸附剂为 C_{18} 、 NH_2 、 CN 等键合硅胶以及 HLB 等聚合材料。在萃取前,萃取柱需要进行冲洗和活化,样品上样后抽干,再用有机溶剂将目标物质淋洗下来,最后将有机溶剂吹干,定容,进行 LC-MS 分析。表 2 列出了近十年来固相萃取在雌激素检测方面的部分应用。

表 2 固相萃取各种基质中的雌激素
Table 2 Solid phase extraction (SPE) of estrogens in various matrices

目标雌激素 Estrogens	基质 Matrix	样品处理 Sample treatment	回收率 Recovery (%)	LOD/LOQ (ng/L)	文献 Ref.
11 种自由态和结合态 雌激素 11 Kinds of free and conjunct estrogens	河水、污水 River water, sewage	Oasis HLB 柱萃取 Oasis HLB extraction	46 ~ 87; E_2 :32	河水 (River water):2-30 污水 (Sewage):10 ~ 100	15
10 种雌激素 10 Kinds of estrogens	河水、污水 River water, sewage	C_{18} 萃取, Florisil 净化 C_{18} extraction, Florisil clean up.	70.4 ~ 106	15 ~ 70	16
15 种雌激素 15 Kinds of estrogens	尿样 Urine	β -环糊精作吸附剂, 正己 烷洗脱雌激素 β -Cyclodextrin extraction, hexane elution.	82 ~ 112	-	17
$17\alpha\text{-E}_2$, $17\beta\text{-E}_2$	牛血清 Calf serum	C_{18} 醋酸盐缓冲溶液萃 取 C_{18} and acetate buffer extraction.	86.3 ~ 93.2	$17\alpha\text{-E}_2$:60 $17\beta\text{-E}_2$:30	18
E_1 , E_2 , E_3 , EE_2 , $\text{E}_1\text{-3S}$	废水 Waste water	C_{18} 柱萃取 C_{18} Extraction.	83 ~ 100	0.1 ~ 0.2	19
E_1 , E_2	人血清 Human serum	PCH 或 PA 衍生雌激素, BOND ELUT 柱萃取 PCH or PA derivation, BOND ELUT extraction	84.4 ~ 96.0	0.5 ~ 1.0	20
EE_2	鼠血清 Rat serum	C_{18} 柱萃取 C_{18} Extraction	89 ~ 94	30	21

3.1.2 固相微萃取 (Solid phase microextraction, SPME) 固相微萃取技术是 20 世纪 90 年代初由加拿大 Pawliszyn 研究小组^[22]首次提出而逐渐发展起来的一种样品前处理技术,其原理与 SPE 相似,差别仅是吸附剂的材料与用量。SPME 装置由手柄和萃取头两部分构成^[23]。萃取头是一根长约 1 cm、涂有不同固相涂层的熔融石英纤维,石英纤维端连接不锈钢内芯,外套有细的不锈钢管,以保护石英纤维不被折断。手柄用于安装和固定萃取头,通过手柄的推动,萃取头可伸出不锈钢针管。固相微萃取主要就是通过萃取头表面的高分子涂层,对样品中的有机分子进行萃取和预富集。

SPME 主要有 3 种萃取模式:(1)直接 SPME 法 将 SPME 萃取纤维直接插入液体样品中;(2)顶空 SPME 法 (Headspace solid phase microextraction, HS-SPME) 将 SPME 萃取纤维置于液体或固体样品的顶空进行萃取;(3)隔膜保护 SPME 萃取 前两种是最常用的,但各具特点。直接 SPME 适用于较干净的液体样品,其优点是吸附平衡快,对目标物没有沸点要求;缺点是容易吸附基质杂质,受干扰较大。顶

空 SPME 克服了基质干扰的缺陷,但是对于高沸点的目标物,该法存在平衡速度慢,富集效率低等缺点。

在对 EDCs 的分析研究中,SPME 法结合 GC 或 GC-MSⁿ,LC 或 LC-MSⁿ均有广泛应用。最近,一种称为管内固相微萃取(in-tube SPME)^[24]的新型萃取方式,显著扩展了 SPME 萃取技术。该技术与传统的纤维针式固相微萃取的不同之处在于,In-tube SPME 的萃取头是一段中空毛细管。样品从中空毛细管通过,固定相被交联到毛细管内壁上,通过增加固定相的涂覆厚度和毛细管的长度及内径,可以获得大于传统 SPME10 倍以上的固定相体积,萃取富集效率明显提高。Feng 研究小组利用 In-tube SPME 技术对雌激素的分析开展了一系列的工作^[25-26]。Fan 等^[25]采用聚(丙烯酸胺-乙烯基吡啶)整体柱作为 SPME 萃取介质。因为该材料与传统的开放式管状毛细管柱相比有更高的比表面,因而有更高的萃取效率。该方法已成功应用于不同来源的环境水样的雌激素检测。此外他们采用相同的方法验证了聚(丙烯酸胺-乙烯基吡啶-*N,N'*-亚甲基双丙烯酸胺)整体柱同样具有作为 In-tube SPME 良好萃取介质的特征^[26]。Mitani 等^[27]在 In-tube SPME 基础上,实现了在线萃取和分析环境水体中 5 种雌激素。该方法与直接进样相比,能将灵敏度提高 34~90 倍。

常用的 SPME 涂层材料有 7 种,而根据极性的不同,适合雌激素的萃取涂层为聚丙烯酸酯(polyacrylate, PA)。Pan 等^[28]采用 PA 纤维萃取顶空萃取 2 mL 水样中的 3 种烷基酚。Carpinteiro 等^[29]直接将 PA 纤维插入水样中,萃取 5 种雌激素,然后再采用顶空方式,用 *N*-甲基-*N'*-(三甲代甲硅烷)三氟乙酰胺(MSTFA)将目标物硅烷衍生化,用 GC-MS² 检测,检出限为 0.2~3 ng/L,明显优于传统的 SPE 方法。

值得一提的是,由于雌激素萃取通常仅仅限于 PA 涂层纤维,而许多商品化萃取头经过 2~3 次的萃取后,涂层会逐渐剥落。为了更好地提高 SPME 的萃取效率,开发了许多新型的吸附剂,并取得很好的效果。Basheer 等^[30]开发了新型 SPME 萃取剂,二羟基聚甲基丙烯酸甲酯(Dihydroxylated polymethylmethacrylate, DHPMM)包被在中空纤维膜上。该材料具有大量的羟基官能团,因而特别容易吸附极性化合物。

针对一种萃取吸附剂只能萃取一类极性化合物的缺陷,Basheer 等^[31]又开发出另一种新型固定相:在熔融石英毛细管上利用溶胶凝胶技术包被两性亲水的低聚物。由于该低聚材料同时具有极性和非极性官能团,因而对极性和非极性化合物都能有效地吸附,极大地扩展了 SPME 技术的使用范围。该材料成功应用于同时检测有机氯农药、三嗪农药、雌激素、烷基酚和双酚 A 等不同极性化合物的萃取和检测中。

3.1.3 基质固相分散(Matrix solid phase dispersion, MSPD) 1989 年, Barker 等^[32]首次提出将 MSPD 用于动物组织中多种药物残留的分离和提取,证明了 MSPD 是一种从复杂植物基质和动物组织中分离药物、农残等有效的萃取方法。MSPD 萃取是将样品(动物肝脏,水果等)加外标或内标后与键合固定相吸附剂(如 C₁₈等)一起研磨,大约 30 s 后将混合物作为填料装柱。然后用不同极性的溶剂淋洗填充柱,实现目标物的分离^[33]。

MSPD 与传统的液-液萃取,固相萃取相比,省去了大量的前处理步骤,因此在制备、萃取、分离样品,特别是对固体或半固体生物组织样品,有着非常明显的优势,前人对 MSPD 的作用机理有详细的综述^[34,35]。

对于固体样品特别是生物组织样品中雌激素的 MSPD 分离检测的研究较多。丁雅韵等^[36]采用基质固相分散和固相萃取结合的办法提取并净化动物肝脏组织中残留的 DES。将 0.5 g 匀浆后的动物肝脏加入 100 μL DES 标样,混匀后加入 2 g C₁₈ 填料研磨。研磨后的半干液体固体状样品混合物均匀装入 10 mL 的底端垫有滤纸的注射筒中,用注射器活塞压至 3.5 mL 后用 8 mL 正己烷淋洗器皿和填充柱,最后用 8 mL 乙酸乙酯洗脱下 DES,进行 GC-MS。刘宏程等^[37]用 MSPD 对牛奶中己烯雌酚(DES)、己烷雌酚(HEX)和双烯雌酚(DS)残留进行提取和净化处理,并通过高效液相色谱进行分离,3 种雌激素的平均回收率为 84.1%~93.5%;DES, HEX 和 DS 的检出限分别为 4.0, 4.0 和 6.0 μg/kg。

3.1.4 其它方法 其它应用于雌激素检测的离线前处理方法还有很多,如:分子印迹固相萃取^[38],磁颗粒萃取^[39],分散固相萃取^[40],搅拌棒吸附萃取(Stir bar sorptive extraction, SBSE)-热解析^[41],浊点萃取(Cloud point extraction, CPE)^[42]等,为样品前处理提供了新方法。

3.2 在线样品前处理及 LC-MS 检测

尽管 SPE 被普遍认为是适用性最广、行之有效的样品前处理方法之一。但是离线 SPE 方法存在的最大问题是步骤烦琐,需要大量的时间进行洗脱、溶剂转换、氮吹等操作步骤,使得样品前处理在整个分析过程中成为制约检测效率的瓶颈。在线 SPE 方法的出现,很好地解决了离线 SPE 的耗时烦琐等缺点,显著提高了检测速度和效率。

与离线 SPE 方法相比,在线 SPE 方法具有以下优点^[43]:(1)样品前处理的时间短,样品通量高。这是在线 SPE 方法最明显的优势;(2)在离线 SPE 中,浓缩后的样品只有少量样品进入后续的 LC-MS 分析中,而在在线 SPE 所有吸附在在线萃取柱上的样品都将洗脱下来进行检测,因而检测灵敏度明显提高;(3)由于在线过程全部自动化,省略了转换溶剂、氮吹等步骤,减少了样品挥发、降解以及人为污染的机会,提高了方法的精密度和准确度;(4)在线方法样品进样量少,洗脱溶剂完全保留进行分析,因此在线 SPE 需要的有机洗脱溶剂较少,降低了实验成本,减轻了环境污染。但与离线 SPE 相比,在线 SPE 同样存在着一些弱点,如建立方法时间长、仪器要求高、基质不易去除等。综上所述,在线 SPE 非常适合大量样品的快速分析以及毒性很强的样品前处理分析,而离线 SPE 适合小样品量的分析。

由于在线 SPE 方法无法像离线 SPE 方法那样进行不同溶剂的净化,因此选择既能有效保留目标物,同时具备较强抗干扰能力,使用寿命长的富集柱是在线 SPE 能否成功的关键,这一点在生物样品的在线检测中显得尤为重要。

3.2.1 烷基键合硅胶富集柱 与离线 SPE 方法一样,基于疏水作用原理的烷基键合硅胶柱(C_8 , C_{18})是应用最广的富集柱之一。但是,这类富集柱在不同基质中均存在非常严重的缺陷。在环境样品的富集中,烷基键合硅胶的选择性较弱,对极性较大的物质保留能力有限,且洗脱时容易同基质中的极性物质(如腐殖酸)一同洗脱下来,干扰后续的检测。由于采用较小颗粒的材料以保证吸附能力,在生物样品的富集中,富集柱容易被基体中蛋白质、脂肪等大分子堵塞,导致柱压严重升高,使用寿命有限。因此,许多学者致力于新型材料富集柱的开发,以取代传统烷基键合硅胶富集柱。

3.2.2 限制进入材料富集柱(Restricted access media, RAM) 限制进入材料(RAM)是 Desilets 等^[44]于 1991 年首次提出的。这类材料通过限制作用位点使大分子无法进入而允许小分子通过孔洞进入并得到保留来实现生物样品的直接进样。材料外表面通常涂覆亲水基团(如甲基纤维素,二醇等),显著减少基体蛋白的吸附,降低了基质干扰。

RAM 材料通过排阻蛋白的机理可分为两大类:一类是物理方式排阻基体大分子,通过材料的孔径限制大分子。该材料的特点为:外表面涂覆二羟基亲水基团用于减少蛋白的吸附,内表面键合不同的烷基链(C_4 , C_8 , C_{18})用于对目标分子的保留。另一类是化学方式排阻大分子,通过颗粒外表面键合蛋白或聚合物,形成网状结构阻碍大分子进入到颗粒中。此材料内外部分分开合成后分别键合到硅胶的内外表面。外表面键合聚乙烯醚聚合物用来阻挡大分子,如蛋白质。内表面键合疏水反相官能团,如氰基、苯基, C_8 和 C_{18} 。该材料在生物样品的分析中广泛应用^[45, 46]。

3.2.3 大颗粒担体富集柱 大颗粒担体富集柱也是专为制备生物样品而设计的。为了避免生物样品中基体蛋白的堵塞,富集柱的填充颗粒一般为 30 ~ 50 μm 。该颗粒大小条件允许高流速的流动相通过柱体而不产生高的背压。高流速流动相有利于蛋白的快速渗透并能保证被分析物通过疏水作用保留到柱上。这一萃取理念早在 1966 年提出^[47],在 20 世纪 80 年代制备出填充柱^[48],并于 1997 年以贯流色谱(Turbulent flow chromatography)为名注册专利。

通常,贯流色谱填充柱的直径为 1 mm i. d.,系统采用的流速为 3 ~ 5 mL/min。目前已出现了多种类型的 TFC 固定相,如微型或毛细管型富集柱填充 50 ~ 60 μm 各种类型的吸附材料。其中商品化最成功,使用最广的 TFC 柱有两种:一种是以硅胶为基质,表面键合经典烷基链(C_2 , C_8 和 C_{18}),苯基、混合型极性/非极性相。Yan 等^[49]开发出大颗粒并且碳链更长的三十烷基键合硅胶材料(C_{30})作为固相萃取材料应用到水体中雌激素的萃取,通过对其萃取性能的评价及与传统 C_{18} 材料的比较,证明了该材料的优越性。另一种是以聚合物为基质,其代表是 Waters 公司推出的亲水亲脂的 Oasis HLB 柱,它是以二乙烯基苯基-N-乙基吡咯酮共聚物为吸附材料。

3.2.4 分子印迹富集柱 (Molecularly-imprinted polymer) 分子印迹聚合物是一种具有较强分子识别能力的新型高分子仿生材料,其最大的优点就是可以根据待测物质的结构合成吸附材料并通过识别位点进行有选择性的富集目标物,而不是传统 SPE 填料通过疏水作用机理实现无选择性的富集。因此, MIP 材料可以选择性地吸附目标物而不易受到基质的干扰,而且易于清洗。此外分子印迹材料本身具较高的耐热、化学侵蚀和高压的特性,且对存放条件无特别的要求,因此 MIP 受到各领域的科研人员的广泛关注。

Sellergren 等^[50]首次将分子印迹技术结合固相萃取技术形成新的样品前处理方法 (MIP-SPE, MI-SPE),应用到药物的选择性吸附富集中。随后,大量文献报道了 MISPE 方法的建立和应用^[51-52]。由于离线 MISPE 与 SPE 一样,存在着繁琐费时、重现性差等缺点,在线 MISPE 得到迅速发展。目前,在线 MISPE 主要有两种方式:最常用的一种方式是将少量的 MIP 颗粒填充到预柱中,经过样品上样和淋洗去除干扰物后,待测目标物被流动性洗脱下来经色谱分离后检测。这种方式首次报道应用于复杂水样、苹果汁和尿液中三嗪类农药的检测中^[53]。另一种 MIPSPE 方式,同样首次由 Sellergren 等^[50]报道。该方式的特点是无需色谱柱分离。因此, MIP 柱同时起到富集样品和分离的作用。此类 MISPE 通常应用于一种实际样品待测物的分析。

由于 MIP 材料具有高度选择性、稳定性、可重复利用性且价格低廉,因此 MIP 颗粒作为在线富集材料广泛地应用于环境、生物样品、食品、药物等各个领域的分析检测中。表 3 列举了近几年部分 MISPE 在不同领域的在线检测应用实例。

表 3 MISPE 在各种基质中的在线分析应用

Table 3 On-line application of molecular imprinted-solid phase extraction (MISPE) in various matrices

待测物 Analytes	基质 Matrix	模板 Template	MIP 合成方法 MIP method	文献 Ref.
双酚 A Bisphenol A	河水 River water	双酚 A Bisphenol A	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	54
4-氯酚 4-chlorophenol	河水 River water	4-氯酚,4-硝基酚 4-chloro- rophenol, 4-nitrophenol	非共价,悬浮聚合 Non-covalent, suspension polymerization	55
抗蚜威 Pirimicarb	自来水,河水,泉水 Tap water, river water, spring water	抗蚜威 Pirimicarb	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	56
五氯酚 Pentachlorophenol	河水,湖水,废水 River water, lake water, waste water	五氯酚 Pentachlorophenol	非共价, SiMIP Non-covalent, SiMIP	57
特丁津 Terbuthylazine	河水 River water	三嗪化合物 Triazines	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	58
头孢氨苄 Cephalexin	血浆,血清 Plasma, serum	头孢氨苄 Cephalexin	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	59
罗哌卡因 Ropivacaine	人血浆 Human serum	罗哌卡因 Ropivacaine	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	60
曲马多 Tramadol	人尿液 Human urine	曲马多 Tramadol	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	61
维拉帕米 Verapamil	尿液,血浆 Urine, plasma	维拉帕米 Verapamil	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	62
赭曲霉毒素 A Ochratoxin A	小麦萃取物 Wheat extraction	赭曲霉毒素 A Ochratoxin A	非共价,本体聚合 Non-covalent, bulk polymerization	63
神经酰胺 Ceramide	酵母脂类萃取物 Yeast	神经酰胺 Ceramide	非共价,原位聚合 Non-covalent, in-situ polymerization	64

尽管 MISPE 具有许多优点而得以广泛的应用。但是在一些方面 MISPE 还有待于进一步的改进。首先, MIP 颗粒的制备过程过于复杂,耗时且需要大量溶剂洗脱模板分子。其次,目前常用的 MIP 制备方法为非共价键合的本体聚合方法,利用这种方法合成的 MIP 中模板分子不易洗脱,而且生长特殊键合位点效率低,这会导致较低样品吸附容量和较高非特异性吸附。最后,模板分子常常会从聚合物上脱落下来,若采用本体聚合的合成方法,将给实际检测带来很大的干扰。

3.2.5 其它类型富集材料 为了寻求更有效、环保且经济的富集柱应用于在线 SPE 分析检测中,许多

学者致力于新材料的开发,包括氨基柱^[65]、巯基柱^[66]、金属配合物^[67]、 β -环糊精键合硅胶柱^[68]、聚合物柱^[69,70]、免疫柱^[71,72],网状石墨柱^[73]以及多壁碳纳米管柱^[74],甚至有学者将棉花^[75]和香烟过滤嘴^[75,77]应用到在线吸附有机污染物中,取得了非常好的吸附效果。这些新材料成本低廉,制备简单,有些还能重复使用,大大拓展了在线 SPE 技术的应用范围,也为其他科研工作者提供了新的研究思路。目前,开发新型富集材料已经成为在线 SPE 技术中最为活跃的研究领域之一。

4 结语与展望

环境雌激素具有极强的生物活性效应,给敏感鱼种或其它生物种群带来极大的威胁。随着人类避孕药、激素补充剂的滥服滥用以及随意处置,这种威胁越来越显著,刻不容缓。同时,环境雌激素经代谢后的代谢产物已被广泛认同与人类某些癌症有着密切关系。因此对于环境雌激素的含量测定和毒理分析,无论是在环境、生态还是医学领域都是非常重要的一个研究课题。

如何准确、快速、可靠的识别和确定复杂基质中雌激素的种类和含量依然是对分析科学家们的一个挑战。固相萃取因其易于操作、价格低廉、适用性广等优点在未来一段时期内还将是雌激素样品前处理的主要方法之一。但是由于固相萃取操作步骤繁琐,费时,溶剂污染环境,且 C_{18} 依赖疏水作用而无选择性吸附,对固相萃取方法的改良必然是未来样品前处理方法研究的一个重要方向。改进的方向主要有两方面,一方面是开发新型的吸附剂。理想的吸附剂应该具备高的吸附容量,易于洗脱且具有较高的选择性。另一方面是萃取方式的改良。在线固相萃取,基质固相分散,分散固相萃取等都是根据实际样品的特点结合实际操作而开发出来的改良型固相萃取。未来将会开发出更多操作简便,可行性高的新的萃取方式。

在检测方面,LC-MS² 是分析不同基质特别是复杂基质中雌激素含量的有效分析方法,在当前成为分析雌激素方法的主流。由于其强大的排除基质干扰,准确定量的能力,在未来的检测分析中还将起着重大作用。同时,在雌激素的种类的识别上,Q-TOF,IT-TOF 等高分辨仪器将会推动定性分析,提供更多有效信息,如结构信息等。

References

- 1 European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, UK, Commission of European Communities, EUR 17549 Brussels, 1997
- 2 Gabet V, Miège C, Bados P, Coquery M. *Trends Anal. Chem.*, 2007, 26(11): 1113 ~ 1131
- 3 D'Ascenzo G D, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. *Sci. Total Environ.*, 2003, 302(1-3): 199 ~ 209
- 4 Xiao X Y, McCalley D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2000, 14(21): 1991 ~ 2001
- 5 Snyder S A, Keith T L, Verbrugge D A, Snyder E M, Gross T S, Kannan K, Giesy J P. *Environ. Sci. Technol.*, 1999, 33(11): 2814 ~ 2820
- 6 Adlercreutz H, Jarvenpaa P. *J. Steroid Bio. Chem.*, 1982, 17(6): 639 ~ 645
- 7 Hamalainen E, Korpela J T, Adlercreutz H. *Gut*, 1987, 28(4): 439 ~ 445
- 8 Adlercreutz H, Martin F. *Acta Endocrinologica*, 1976, 83(2): 410 ~ 419
- 9 Adlercreutz H, Gorbach S L, Goldin B R, Woods M N, Dwyer J T, Hamalainen E. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1994, 86(14): 1076 ~ 1082
- 10 Goldin B R, Adlercreutz H, Dwyer J T, Swenson L, Warram J H, Gorbach S L. *Cancer Res.*, 1981, 41(9): 3771 ~ 3773
- 11 Dao T L, Morreal C, Nemoto T. *Engl. J. Med.*, 1973, 289(3): 138 ~ 140
- 12 Maier R M, Pepper I L, Gerba C P. *Environmental Microbiology*. New York: Academic Press, 2000: 61 ~ 80
- 13 Lange I G, Daxenberger A, Schiffer B, Witters H, Ibarreta D, Meyer H H D. *Anal. Chim. Acta*, 2002, 473(1-2): 27 ~ 37
- 14 Sun L, Yong W, Chu X, Lin J M. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(28): 5416 ~ 5423
- 15 Pedrouzo M, Borrull F, Pocurull E, Marcé R M. *Talanta*, 2009, 78(4-5): 1327 ~ 1331
- 16 Yan W, Zhao L, Feng Q, Wei Y, Lin J M. *Chromatographia*, 2009, 69(7-8): 621 ~ 628

- 17 Moon J Y, Jung H J, Moon M H, Chung B C, Choi M H. *Steroids*, **2008**, 73(11): 1090 ~ 1097
- 18 Ferretti G, Ferranti C, Crovella T, Fiori M, Civitareale C, Marchiafava C, Quadri F, Cammarata P, Palleschi L. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 871(1): 135 ~ 140
- 19 Koh Y K K, Chiu T Y, Boobis A, Cartmell E, Lester J N, Scrimshaw M D. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(24): 4923 ~ 4926
- 20 Yamashita K, Okuyama M, Watanabe Y, Honma S, Kobayashi S, Numazawa M. *Steroids*, **2007**, 72(11-12): 819 ~ 827
- 21 Twaddle N C, Churchwell M I, Newbold R R, Delclos K B, Doerge D R. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 793(2): 309 ~ 315
- 22 Arthur C L, Pawliszyn J. *Anal. Chem.*, **1990**, 62(19): 2145 ~ 2148
- 23 LI Gong-Ke(李攻科), HU Yu-Ling(胡玉玲), RUAN Gi-Hua(阮贵华). *Apparatus and Equipment for Sample Pretreatment(样品前处理仪器与装置)*, Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), **2007**: 36
- 24 Eisert R, Pawliszyn J. *Anal. Chem.*, **1997**, 69(16): 3140 ~ 3147
- 25 Fan Y, Zhang M, Da S L, Feng Y Q. *Analyst*, **2005**, 130: 1065 ~ 1069
- 26 Fan Y, Zhang M, Feng Y Q. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1099(1-2): 84 ~ 91
- 27 Mitani K, Fujioka M, Kataoka H. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1081(2): 218 ~ 224
- 28 Pan Y P, Tsai S W. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 624(2): 247 ~ 252
- 29 Carpinteiro J, Quintana J B, Rodriguez I, Carro A M, Lorenzo R A, Cela R. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1056(1-2): 179 ~ 185
- 30 Basheer C, Jayaraman A, Kee M K, Valiyaveetil S, Lee H K. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1100(2): 137 ~ 143
- 31 Basheer C, Jegadesan S, Valiyaveetil S, Lee H K. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1087(1-2): 252 ~ 258
- 32 Barker S A, Long A R, Short C R. *J. Chromatogr. A*, **1989**, 475(2): 353 ~ 361
- 33 Barker S A. *J. BioChem. Biophys. Methods*, **2007**, 70(2): 151 ~ 162
- 34 Barker S A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 880(1-2): 63 ~ 68
- 35 Barker S A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885(1-2): 115 ~ 27
- 36 DING Ya-Yun(丁雅韵), XU Xiao-Yun(徐晓云), XIE Meng-Xia(谢孟峡), YANG Qing-Feng(杨清峰), LIU Su-Ying(刘素英). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2003**, 31(11): 1356 ~ 1359
- 37 LIU Hong-Cheng(刘宏程), ZOU Yan-Hong(邹艳红), LI Qi-Wan(黎其万). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2008**, 36(2): 245 ~ 248
- 38 Jiang T, Zhao L, Chu B, Feng Q, Yan W, Lin J M. *Talanta*, **2009**, 78(2): 442 ~ 447
- 39 Liu Y, Jia L. *MicroChem.*, **2008**, 89(1): 72 ~ 76
- 40 Dong X, Zhao L, Guo G, Lin J M. *Anal. Lett.*, **2009**, 42(1): 29 ~ 44
- 41 Imeida C, Nogueira J M F. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2006**, 41(4): 1303 ~ 1311
- 42 Wang L, Cai Y Q, He B, Yuan C G, Shen D Z, Shao J, Jiang G B. *Talanta*, **2006**, 70(1): 47 ~ 51
- 43 Rodriguez-Mozaz S, Lopez de Alda M J, Barceló D. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1152(1-2): 97 ~ 115
- 44 Desilets C P, Rounds M A, Regnier F E. *J. Chromatogr. A*, **1991**, 544: 25 ~ 39
- 45 Capka V, Xu Y. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 762(2): 181 ~ 192
- 46 Liu M, Yan W, Lin J M, Hashi Y, Liu L B, Wei Y. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1198/1199: 87 ~ 94
- 47 Pretorius V, Smuts T W. *Anal. Chem.*, **1996**, 38(2): 274 ~ 279
- 48 Martin M, Guiochon G. *Anal. Chem.*, **1982**, 54(9): 1533 ~ 1540
- 49 Yan W, Zhao L, Feng Q, Lin J M. *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31(20): 3581 ~ 3587
- 50 Sellergren B. *Anal. Chem.*, **1994**, 66(9): 1578 ~ 1582
- 51 Hu S G, Li L, He X W. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1062(1): 31 ~ 37
- 52 Le Moullec S, Bégos A, Pichon V, Bellier B. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1108(1): 7 ~ 13
- 53 Bjarnason B, Chimuka L, Ramström O. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(11): 2152 ~ 2156
- 54 Vicente B S, Villoslada F N, Moreno-Bondi M C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2004**, 380(1): 115 ~ 122
- 55 Caro E, Marcé R M, Cormack P A G, Sherrington D C, Borrull F. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 995(1-2): 233 ~ 238
- 56 Mena M L, Martinez-Ruiz P, Reviejo A J, Pingarrón J M. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 451(2): 297 ~ 304
- 57 Han D M, Fang G Z, Yan X P. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1100(2): 131 ~ 136
- 58 Koeber R, Fleischer C, Lanza F, Boos K S, Sellergren B, Barceló D. *Anal. Chem.*, **2001**, 73(11): 2437 ~ 2444

- 59 Lai E P C , Wu S G. *Anal. Chim. Acta* ,**2003** ,481(2) : 165 ~ 174
- 60 Abdel-Rehim M , Andersson L I , Altun Z , Blomberg L G. *J. Liq. Chromatogr.* ,**2006** ,29(12) : 1725 ~ 1736
- 61 Boos K S , Fleischer C T. *J. Anal. Chem.* ,**2001** ,371(1) : 16 ~ 20
- 62 Mullett W M , Walles M , Levens K , Borlak J , Pawliszyn J. *J. Chromatogr. B* ,**2004** ,801(2) : 297 ~ 306
- 63 Zhou S N , Lai E P C , Miller J D. *Anal. Bioanal. Chem.* ,**2004** ,378(8) : 1903 ~ 1906
- 64 Zhang M L , Xie J P , Zhou Q , Chen G Q , Liu Z. *J. Chromatogr. A* ,**2003** ,984(2) : 173 ~ 183
- 65 Chao M R , Wang C J , Yang H H , Chang L W , Hu C W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* ,**2005** ,19 : 2427 ~ 2432
- 66 Calderoli S , Colombo E , Frigerio E , James C A , Sibum M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* ,**2003** ,32(4-5) : 601 ~ 607
- 67 Zhou Y Y , Yan X P , Kim K N , Wang S W , Liu M G. *J. Chromatogr. A* ,**2006** ,1116(1-2) : 172 ~ 178
- 68 Fan Y , Feng Y Q , Da S L. *Anal. Chim. Acta* ,**2003** ,484(2) : 145 ~ 153
- 69 Fontanals N , Galitè M , Cormack P A G , Marcé R M , Sherrington D C , Borrull F. *J. Chromatogr. A* ,**2005** ,1075(1-2) : 51 ~ 56
- 70 Bagheri H , Mohammadi A , Salemi A. *Anal. Chim. Acta* ,**2004** ,513(2) : 445 ~ 449.
- 71 Pichon V , Chen L , Durand N , Le Goffic F , Hennion M C. *J. Chromatogr. A* ,**1996** ,725(1) : 107 ~ 119
- 72 Lu A C , Sutono Y , Chou T Y. *Anal. Chim. Acta* ,**2006** ,576(1) : 50 ~ 54
- 73 Zhou Y Y , Wang S W , Kim K N , Li J H , Yan X P. *Talanta* ,**2006** ,69(4) : 970 ~ 975
- 74 Fang G Z , He J X , Wang S. *J. Chromatogr. A* ,**2006** ,1127(1-2) : 12 ~ 17
- 75 Liu J F , Chi Y G , Jiang G B , Tai C , Hu J T. *Micro. J.* ,**2004** ,77 : 19 ~ 22
- 76 Liang H D , Han D M , Yan X P. *J. Chromatogr. A* ,**2006** ,1103(1) : 9 ~ 14
- 77 Wang S , Huang W , Fang G , He J , Zhang Y. *Anal. Chim. Acta* ,**2008** ,606(2) : 194 ~ 201

Progress in Sample Pretreatment for Analysis of Estrogens with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

YAN Wei¹ , LIN Jin-Ming^{*2}

¹(State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology , Research Center for Eco-Environmental Sciences ,
Chinese Academy of Sciences , Beijing 100085)

²(Department of Chemistry , Tsinghua University , Beijing 100084)

Abstract In this review , two parts are mainly introduced. The one is about various aspects of estrogens in environmental waters. The other one is the introduction of current sample pretreatment methods for estrogens and their application in recent years. 77 references were cited in this review.

Keywords Estrogens; Sample pretreatment; Liquid chromatography-mass spectrometry; Review

(Received 25 June 2009; accepted 7 December 2009)