

# 废水中雌激素和孕激素检测方法

王玲<sup>1</sup>, 郑明刚<sup>2</sup>, 兰靖<sup>3</sup>, 刘峰<sup>2</sup>

1. 青岛大学化学化工与环境学院, 山东青岛 266071

2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东青岛 266101

3. 青岛农业大学化学与药学院, 山东青岛 266109

**摘要** 由于污水处理厂的处理能力有限以及水产家禽养殖业的大量发展, 水体中存有一定浓度的雌激素以及孕激素等相关的合成化合物。这些化合物在很低的浓度就具有很强的雌激素活性, 能够改变野生生物组织正常的生殖发育。已有不同的方法检测污水处理厂进出水中的这些化合物情况, 以此评价污水处理效率和环境风险。但由于这些物质在水中的浓度很低, 容易降解, 且污水中存在大量悬浮物颗粒、有机物、无机离子等复杂机体的干扰, 加大了检测污水中的雌激素和孕激素的难度。本文回顾了已有的检测废水中这些重要环境污染物的分析方法, 讨论了从样品处理到分析检测主要的步骤, 对比了各种方法灵敏度和适用范围, 并对该领域研究进行了展望。

**关键词** 雌激素; 孕激素; 废水; 分析方法

中图分类号 X132

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.09.012

## Analytical Methods for the Determination of Estrogens and Progestogens in Wastewater

WANG Ling<sup>1</sup>, ZHENG Minggang<sup>2</sup>, LAN Jing<sup>3</sup>, LIU Feng<sup>2</sup>

1. College of Chemical Engineering and Environmental Sciences, Qingdao University, Qingdao 266071, Shandong Province, China

2. The First Institute of Oceanography, Qingdao 266101, Shandong Province, China

3. College of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, Shandong Province, China

**Abstract** Estrogens and related synthetic compounds have been detected in the aquatic environment, mainly as a result of effluent outfalls of inefficient removal in Waste-Water-Treatment Plants (WWTP) and the excrement of aquaculture and poultry. These compounds show the high physiological activity with very low concentrations and have been associated with certain alarming effects on reproduction and developmental processes. Even with a concentration of 5–6 ng/L, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol can exterminate entire fish populations in a whole lake experiment within three years due to the feminization of male fishes. In the last 10 years, an increasing number of studies have been conducted to develop analytical procedures for estimating the levels of the estrogens in the influent and effluent of WWTP and evaluating the risk to human beings and ecosystem. Due to the low concentration and complicated matrix in the wastewater, the determination of natural and synthetic estrogens in wastewater becomes a difficult analytical task. The existing analytical methods for the analyzing these estrogens in wastewater from samplings to procedures, and the methods commonly used in the determination are reviewed.

**Keywords** estrogen; progestogen; wastewater; analytical method

### 0 引言

20世纪80年代, 东京西郊、英国南部和美国佛罗里达州的野生动物出现了生殖障碍、发育异常及雄性个体雌性化等

现象。调查研究认为, 这些现象的发生同环境污染密切相关。

1996年, Colborn等<sup>[1]</sup>的《Our Stolen Future》一书, 向人们展示了具有激素功能化合物对生物体内分泌系统的干扰所造成的

收稿日期: 2010-02-23; 修回日期: 2011-02-02

基金项目: 山东省自然科学基金青年基金项目(ZR2010BQ025); 国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室开放基金项目(MBSMAT-2009-06)

作者简介: 王玲, 讲师, 研究方向为环境科学, 电子信箱: qd\_wling@sohu.com

危害——雌性化、发育缺陷和生殖能力下降等,这些影响最终都可能导致种群的灭绝,因而引起全世界对环境激素问题的广泛关注。进入 21 世纪后,安大略湖西北部,由于雌激素浓度连续 3 年为  $5\text{--}6\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,雄鱼雌性化而失去繁殖能力,整个湖中的鱼类全部灭绝<sup>[2]</sup>。越来越多的调查结果表明,人类的生殖障碍、发育异常及某些癌症如乳腺癌、睾丸癌和卵巢癌等与雌激素有关。天然存在的具有激素功能的物质包括雌二醇、雌酮和雌三醇。雌二醇,由卵巢分泌的一种雌激素,用以补充雌激素的不足,环境中存在的雌二醇主要来自于哺乳动物排泄物。也有报道指出,农畜、水产养殖的大量发展,使个别地区的雌二醇水平明显提高<sup>[3]</sup>,已经引起公众的广泛关注。雌酮和雌三醇是雌二醇的代谢产物或者前身物质,通过生物免疫实验证实,它们的雌活性比雌二醇低 5—1000 倍<sup>[4]</sup>。孕酮,由卵巢的黄体 and 胎盘分泌,为受精卵在子宫内种植和保证妊娠作准备,保持受孕,促进乳腺的增大,也可由天然或人工黄体荷尔蒙制备成药物,用来预防流产以及治疗月经紊乱。还有其他几种比较受关注的人工合成雌激素,如炔雌醇、炔诺酮、左旋甲基炔诺酮等。炔雌醇是由雌二醇合成,比雌二醇更稳定的化合物<sup>[5]</sup>,用于避孕、治疗癌症和荷尔蒙紊乱,妇女绝经期后由于雌激素缺乏而发生的骨质疏松症及其引起的其他疾病,但是也有报道指出,口服炔雌醇后,经代谢过程,排泄物是雌酮、雌二醇。此外,作为口服避孕药被大量使用的合成孕激素如炔诺酮、左旋甲基炔诺酮等都具有比天然雌激素更高的活性。

关于雌激素、孕激素环境污染的报告揭示生活污水是其主要来源<sup>[6-7]</sup>。另外也有报道指出,在农畜、水产养殖厂的附近,检测到高浓度的雌激素,而且已经对附近的地下水和地表水有影响,说明这是污水处理厂之外的另外一种重要污染源。鉴于雌激素的危害性,大量的官方环境组织和特别的研究小组开始研究合适的检测手段,监测废水中雌激素和孕激素的含量,评价污水处理厂的效率,提升大众对这类物质对人类以及野生生物的命运的持续性,长期性的影响的认识。在这个领域很多发达国家已经做了大量的报道<sup>[8-9]</sup>。目前在中国也开始了关于雌激素、孕激素分析方法的初步研究<sup>[10]</sup>。

由于废水中基质复杂,而被分析的目标雌激素和孕激素污染物浓度通常很低,而且在环境中极不稳定,因此对建立准确灵敏的分析方法提出了很高的要求。目前针对这类化合物,国内外已开展了相对广泛的分析方法学研究,由于分析目标化合物不同,采用仪器手段各异,所建方法检测限( $\sim\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ )与应用范围也有所不同。本文针对污水处理厂水样中雌激素和孕激素分析检测方法进行了全面的归纳和总结,着重介绍现有检测废水中这类重要环境污染物的技术发展水平,从而为相关研究人员提供技术参考。

## 1 前处理过程

### 1.1 标准物质

自然及合成雌激素、孕激素包括雌二醇( $17\beta\text{-estradiol}$ ),

炔雌醇 ( $17\alpha\text{-ethynyl-estradiol}$ ), 雌酮 (estrone), 雌三醇 (estriol), 炔雌醇甲醚 (mestranol), 孕酮 (progesterone), 炔诺酮 (norethindrone), 左旋甲基炔诺酮 (levonorgestrel) 等, 这些物质是当前比较受关注的内分泌干扰物, 它们的标准纯品均为粉末状。在质谱检测中通常用各种标准物质的氘代或  $^{13}\text{C}$  同位素作为内标, 但由于这些同位素标准价格相对比较昂贵, 也可采用胆固醇醋酸盐 (cholesterol-acetate) 或者胆固醇丁酸盐 (cholesterol-n-butylate) 替代作为内源性和外源性雌激素的分析内标。各雌激素标准母液一般采用甲醇作为溶剂,  $4^\circ\text{C}$  避光保存。

### 1.2 样品采集与预处理

除个别现场萃取样品, 采集的样品通常保存在用有机溶剂和去离子水清洗的棕色玻璃容器中<sup>[11]</sup>。对污水处理厂水样, 可以采用连续和离散两种采样方式, 其中连续采样周期从  $6\text{h}$ <sup>[12]</sup>— $5\text{d}$ <sup>[13]</sup> 不等, 这种采样方式获得的样品是能够代表污水处理厂的典型样品, 但是也要考虑到由于雌激素和孕激素的不稳定性, 过长的采样周期过程中的降解会带来结果的不准确; 评价污水处理能力时, 离散采样一般不能很恰当地评价污水处理厂进水和出水中雌激素以及外源性雌激素的浓度水平, 但是由于采样条件的限制和该类污染物本身的不稳定性, 大部分监测工作采用相对快速简便的离散采样方式。

一般来说, 如果不加甲醛等保存试剂, 在  $4^\circ\text{C}$  条件下, 从采集到萃取, 不应超过 48h。Baronti 等<sup>[14]</sup>第一次监测了河水保存过程中雌激素的降解。根据他们的研究, 最好的保存方法是, 样品经固相萃取后, 氮气吹干固相萃取柱, 甲醇洗脱,  $-18^\circ\text{C}$  保存, 这样便于高通量监测, 保存的样品 60d 后没有检测到重大损失。当加入 1% 的甲醛保存水样时, 24d 后没有明显损失, 但是如果不加甲醛, 会有严重损失。其他作者吸取了 Baronti 等的经验, 加入如甲醛 (1% V/V)<sup>[8]</sup>、甲醇、硫酸<sup>[15]</sup>、氯化汞<sup>[16]</sup>等化学物质降低细菌活性。Shore 等<sup>[17]</sup>详细说明了水样在有保护试剂和没有保护试剂的条件下, 雌激素的降解情况。如果样品萃取后不能马上检测, 也可以把样品储存在固相萃取小柱上, 氮气吹干后冷冻保存, 这样有利于批量样品的处理和保存, 提高工作效率<sup>[13,18]</sup>。一般情况下, 采集的样品即使能够在 24h 内处理, 最好也加入 1% 的甲醛等保护试剂, 避光保存在  $4^\circ\text{C}$  下, 因为整个处理过程比较漫长, 即使是加标自来水在 24h 后也会有 20%—30% 的分析物降解<sup>[19]</sup>。

采样体积主要取决于样品来源, 处理方法和检测技术。Shore 等<sup>[17]</sup>用放射免疫分析的方法分析, 需要样品体积  $50\text{mL}\text{--}20\text{L}$  不等, Tabak 等<sup>[19]</sup>用液液萃取, 气相色谱检测的方法甚至用了 80L 水样。近几年由于 LC-MS-MS 的使用, 仪器灵敏度能够低于  $\text{ng/mL}$ , 因此大大降低了样品体积, 一般只需  $500\text{mL}\text{--}2\text{L}$ 。

### 1.3 样品前处理

过滤。由于废水中高含量的有机材料和悬浮颗粒物, 因此过滤是样品处理的第一步。特别是使用固相萃取方法富集样品时, 因为悬浮颗粒物很容易堵塞萃取装置, 或者在用免

疫方法分析时,颗粒物可能会引起不必要的抗体吸附,所以过滤步骤是必不可少、至关重要的一步。过滤可以与样品采集或者萃取同步进行,也可以单独进行。主要取决于滤膜的使用,特别是实物形态(衬垫、萃取材料、玻璃纤维等)的直径和过滤支持物。大部分研究都使用直径  $0.45\mu\text{m}$  玻璃纤维膜过滤,而且过滤和萃取单独进行的更为普遍。一些实验证明,雌激素和外源性雌激素不会保留在吸附材料上而是以溶解态存在于水样中。加标雌二醇废水经过滤,萃取和纯化步骤后,回收率达 99%<sup>[20]</sup>。

对于污水处理厂的入水,通常含大量悬浮颗粒物和杂质,不易过滤,因此一些作者用离心分离的方式移走悬浮物代替过滤<sup>[21]</sup>。当然,如果用传统的液相萃取,就不需要任何过滤或离心分离步骤。

萃取。已经发表的方法有固相萃取、液液萃取、固相微萃取<sup>[22]</sup>、浊点萃取<sup>[23]</sup>等。常用的方法是离线固相萃取,在线固相萃取<sup>[24]</sup>由于要求仪器配套,所以还没有被广泛推广。固相萃取盘和柱子都是常用的选择,两者比较,柱子容易被悬浮颗粒物堵塞,而盘的萃取速率相对快,污染少<sup>[25]</sup>。但是考虑到其他因素,比如洗脱的有机溶剂,柱子用量相对较少,造成较小环境问题。而且可以通过过滤除悬浮颗粒物来解决柱子堵塞的问题。萃取柱较萃取盘还有诸多优势,因为已经存在无须人照看的洗→活化→上样→洗→干燥,最后的洗脱全部在线完成的自动装置,大大节省了人力资源,所以近年来,绝大部分工作都是采用萃取小柱完成的。

硅胶修饰的 C18 是目前应用最广泛的填充材料,可填充萃取柱<sup>[26]</sup>、萃取盘<sup>[25]</sup>。还有石墨化炭黑填充柱<sup>[27]</sup>、SDB 柱、商业化的 Isolut ENV+柱<sup>[18]</sup>、SDB-XC 盘<sup>[28]</sup>都有应用。近年来的 Oasis HLB(Waters)萃取小柱,因其填料的高稳定性和高的萃取效率,在萃取废水中痕量雌激素时,更加受到广大环境工作者的青睐,但是价格也比普通的萃取小柱高很多。虽然对于这几种目标分析物,这些填料的萃取效率都很高,但是最近有研究表明,比较 C18 和 SDB 的萃取效率,由于雌三醇有相对高的极性,所以在 SDB 小柱中的保留不强,而 C18 可以有效萃取水中雌三醇。还有研究人员把 C18 和 SDB 柱连接成复合柱使用,对于目标化合物得到满意的回收率<sup>[29-30]</sup>,固相萃取(SPE)串联使用时有商品化的通用接头可供选择。

萃取的样品通常是未经处理的废水,样品也没有调节 pH 值或加入改良剂。一些例外的情况是样品中加入 1%—2% 甲醇,有助于 SPE<sup>[13]</sup>或过滤<sup>[27]</sup>,还有研究人员调节 pH 值(3—5)<sup>[8,21,29]</sup>,这些对回收率没有大的影响。Quintana 等<sup>[10]</sup>用 0.1mol/L 的 HCl 或者 NaOH 调节废水样品 pH 值在中性范围内有利于降低腐殖酸在固相萃取柱上的保留,使萃取到的样品更干净;他们还考查了固相萃取柱的穿透体积,通过串联两根相同的柱子萃取 2000mL 加标纯水,在第二根柱子上未有检出,然后再萃取加标出水水样,在第二根上也未有检出,但是萃取到 1500—1600mL 时,固相萃取柱可能会有堵塞,因此萃取的体积最好控制在 1000mL 以内。一般情况下,上样速

率保持在 10—20mL/min。萃取结束后,用 10mL 去离子水清洗萃取柱。接下来的干燥步骤,不管用氮气还是空气,都没有导致损失的报道。通常在不超过 40℃ 的条件下用普氮吹 1h。

洗脱溶剂的选择和溶剂的体积、洗脱的步骤主要取决于吸附材料和萃取结构(盘或者柱)。这里以现在通用的萃取柱为例,一般的洗脱试剂有纯甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷,或者是两种按一定比例的混合物。太强的洗脱溶剂既可将分析物洗脱下来,也可能将较多的杂质同时洗脱下来,干扰后续测定。有时为了得到干净的洗脱溶液,宁愿选择较弱的溶剂,使用较大体积的溶剂将分析物洗脱后,再用氮气吹干。只要体积超过 5mL,回收率一般都在 90% 以上<sup>[8]</sup>。

当萃取污水处理厂的入水时,由于入水中含大量悬浮颗粒物和杂质,不易过滤,也无法进行固相萃取,所以通常选择液液萃取。虽然很少有这方面的文章,笔者的萃取步骤:取 400mL 入水于 500mL 分液漏斗中,加入 40mL 二氯甲烷,振荡 3min,静置分层,收集下层二氯甲烷萃取液,重复 3 次,合并萃取液,旋转蒸发,剩下 1—2mL 留待继续纯化。但是实验结果证实,虽然液液萃取需要大量的有毒溶剂(如二氯甲烷),而且步骤繁琐,但是回收率在 90% 以上。

#### 1.4 纯化

从废水中萃取的物质在分析检测前需要进一步纯化,如液液萃取、固相萃取等。常用的有硅胶(magisil)填充柱,具有高净化效果,能够有效去除油脂;硅胶(silica)填充柱,用于分离非极性、弱极性化合物和油脂等,特别是结构相似的上述物质;氨基柱,是以硅胶为基质的氨基萃取柱,可以用于去除样品中的磺酸根等强阴离子;还有一种与  $\text{NH}_2$  相似的吸附柱 PSA,有两个氨基修饰,能够有效去除有机酸、色素、金属离子和酚类,因此 PSA 更适合孕激素类没有酚基的化合物,对于雌激素会降低回收率;还有用凝胶渗透色谱<sup>[29]</sup>和高效液相色谱馏分<sup>[11,3]</sup>以及这些柱子串联在一起的复合柱<sup>[12,18]</sup>。检测废水中这些痕量化合物,通常需要 3 步纯化步骤,如果没有纯化步骤,只有通过生物方法检测才能获得满意的检测限<sup>[20-21]</sup>,还有一些研究人员用石墨化炭黑萃取柱固相萃取,LC-MS-MS 分析检测<sup>[14,27-28]</sup>。根据已经建立的可靠方法,如果只用 florisil 填充柱纯化萃取的物质,干扰很明显,即使加标 5ng/L 富集 1000 倍的实际废水样品,用 LC-MS-MS 也无法检测到。所以一般都会再加一步氨基柱纯化,进一步去除腐殖酸和色素,检测限也可以降到低于 ng/L 的水平。因此也使分析方法更加繁琐,耗时。Shore 等<sup>[17]</sup>把固相萃取的分析物用正相制备色谱收集一定波长下馏分的方法纯化,然后用体积排阻色谱收集馏分进一步纯化,得到了很好的回收率和纯化效果。Desbrow 等<sup>[18]</sup>在分析环境水样时一般都包括这些纯化步骤。

#### 1.5 浓缩

为了达到整个方法的有效灵敏度,或者是溶剂交换,萃取液通常需要浓缩。一般在一个完整的分析步骤中,会有几次浓缩过程。根据要被浓缩的萃取物体积和温度(不能高于 40℃)选择旋转蒸发或者氮气吹干。虽然 Baronti 等<sup>[14]</sup>报道了如

果萃取物完全变干后,会有分析物的损失,但是 Huang 等<sup>[20]</sup>获得了满意的回收率,得出了最终的结论:吹干步骤损失很小,所以浓缩步骤对于分析雌激素,孕激素并不是决定性的。尽管如此,应该谨慎对待,使损失最小化,这包括控制氮气流速、防止光照(避免光降解),不要长时间的不完全干燥放置(因为雌激素在水中容易降解)。

## 2 分析技术

检测废水中的雌激素和孕激素常用的方法包括生物技术和气相色谱-质谱联用以及越来越多的液相色谱-质谱联用,所有技术都有其优缺点。

### 2.1 生物技术

Huang 等<sup>[20]</sup>用酶联免疫的方法检测污水处理厂出水中经过 C18 萃取,酶水解,HPLC 制备柱馏分的雌二醇、炔基雌二醇以及雌二醇的葡萄糖和硫酸结合体。用多克隆抗体检测雌二醇和炔基雌二醇与另外几种雌激素的交叉反应率小于 1%,测定波长为吸收 630nm,发射 450nm,方法检测限 0.1ng/L。Tschmelak 等<sup>[24]</sup>用选择性的生物传感器检测雌酮,检测限达到 1.4ng/L。Shishida 等<sup>[26]</sup>报道了相似的方法,检测半工业试验规模的污水处理厂出水中的雌二醇,具有略低的检测限,用 SepPak C18 柱萃取后,方法的检测限达到 10ng/L。Snyder 等<sup>[11]</sup>用免疫的方法检测了废水出水中的雌二醇和炔基雌二醇,样品是经 SDB 盘固相萃取,HPLC 制备柱获得的馏分,该方法检测限达到 pg/L。测定雌二醇的抗体血清与雌酮的交叉反应率 11.2%,雌三醇 1.7%,炔雌醇等 0.1%。炔雌醇的抗体血清与雌二醇的交叉反应率小于 0.3%,炔诺酮(一种口服避孕药)小于 0.1%。Shore 等<sup>[17]</sup>也用放射免疫的方法检测污水处理厂进水和出水中的雌二醇,样品经 C18 萃取,由于雌二醇的抗体与雌酮的交叉反应为 25%,导致测得的雌激素水平在 nmol/L 或 pmol/L,检测限为 2ng/L。虽然有以上报道,但是到目前为止,还没有很完善的生物技术用来检测废水中的雌激素和孕激素,其更多应用于生物样品和体液的检测。

### 2.2 高效液相色谱

由于液相色谱仪器技术的提高,特别是与质谱的联用,大大降低了方法的检测限,使 LC-MS 和 LC-MS-MS 技术得到迅速的发展。一般分离都是在 ODS, ZORBAX, Xterra 等色谱柱上,Shao 等<sup>[35]</sup>和 Hu 等<sup>[36]</sup>的研究发现,苯基柱有更好的分离效率,一般以水和己腈混合液作为流动相。当与质谱联用时,为了提高质谱灵敏度,可能在流动相中加入甲氨<sup>[44]</sup>或者三乙胺<sup>[28]</sup>,加强弱酸性物质雌激素的离子化效率。虽然 Snyder 等<sup>[11]</sup>用荧光检测的方法,测定废水出水中的 E2, EE2, López de Alda 等<sup>[24]</sup>用二极管阵列紫外检测器检测了各种水中雌激素和孕激素,样品用在线固相萃取的方法富集,但是由于机体复杂,干扰明显,紫外检测器在定性时不太准确,所以 LC-MS 联用更为普遍可靠。

随着大气压化学电离(APCI)技术的成熟和商品化仪器的普及,电喷雾电离(ESI)和 APCI 是目前环境有机污染物分

析中最常用的两种电离方法,也是 HPLC-MS-MS 法分析类固醇化合物时普遍采用的离子化方式。在 Laganù 等<sup>[27]</sup>的研究中,用 HPLC-MS-MS 检测生活污水处理厂出水中的痕量雌激素,在正离子态下,APCI(定量限 LOQ:0.5—1ng/L)离子源也能提供与 ESI(LOQ:0.08—0.6ng/L)离子源相似的检测限。但是在实际应用中,除了少数作者使用 APCI 源<sup>[27]</sup>,大部分作者都使用了 ESI 离子源接口,负离子状态<sup>[17]</sup>检测雌激素,正离子检测孕激素。因为这几类化合物的弱极性,电离比较难,灵敏度不是很好,在优化各个条件时,笔者发现不同于其他化合物,除了锥孔电压外,气化温度和去溶剂气流量,对灵敏度都会有明显的影响。

三重四级质谱的推广使用提高检测的选择性和灵敏度,从而得到比单级质谱更好的检测限<sup>[17]</sup>。在这些不同的 HPLC-MS-MS 检测雌激素的方法中,鉴定的可靠标准是:①与标准物质相比,样品的保留时间变化应该在 2%以内;②绝对相关丰度应该在标准物质母离子/子离子比值的 20%范围内。比如,在用 HPLC-MS-MS 方法 ESI 离子源分析相关雌激素时,雌三醇(母离子/子离子)为 287/171,287/145;雌二醇为 271/183,271/145;炔雌醇为 295/159,295/145;雌酮为 269/145,269/159,孕酮为 315/97,315/109。

### 2.3 气相色谱-质谱

气相色谱-质谱联用是目前检测雌激素最常用的仪器。根据所要分析的目标化合物,选择不同的分离条件,不同的联用体系有不同的检测限,约为 0.5—74ng/L 和 0.1—2.4ng/L。这就说明,就灵敏度而言,GC-MS-MS 和 HPLC-MS-MS 差别不大,后者稍好一些。常用的色谱柱类型有 DB-5 MS(30m×0.32mm (i.d.),df:0.25μm),BP-5 (30m×0.25mm (i.d.),df:0.25μm)和 BP-1(30m×0.32mm (i.d.),df:0.17μm)等类型。升温程序:80℃(4min)→200℃(20℃/min)→300℃(8℃/min,2.5min),总分析时间 25min。为了缩短分析时间,可以把开始的柱温升高到 100℃,进样口温度一般在 280℃。由于这些类固醇化合物不容易挥发,因此在 GC-MS 分析前,需要对样品进行衍生化处理,但是这样可能有样品损失<sup>[25]</sup>,而且因为衍生效率受温度和时间的影响较为明显,所以同样样品重复进样时,可能会有较大的偏差造成精度较低的测定结果。Zuo 等<sup>[39]</sup>对衍生工作做了很详细的研究,可优化的条件包括温度、时间、溶剂和衍生试剂量等。

通常选用的衍生试剂包括:双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(Bis-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid)含 10%三甲基氯硅烷(trimethylchlorosilane)<sup>[35]</sup>;氮-甲基-氮-(叔丁基二甲基硅三氟乙酰胺)(N-methyl-N-(tert-butyl)dimethylsilyltrifluoroacetamide)(MTBSTFA)含 1%叔丁基二甲基氯硅烷(tert-butyl)dimethylchlorosilane)(TMCS)<sup>[25,20]</sup>;氮-甲基-氮-(三甲基硅)三氟乙酰胺-三甲基硅咪唑(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA))/trimethylsilylimidazole (TMSI)/二硫代赤藻糖醇(dithioerytrol)(DTE),MSTFA:TMSI:DTE=1000:2:2(V/V/W)<sup>[20]</sup>;七氟酪酸酐(Heptafluorobutyric anhydride)<sup>[20]</sup>;五

氟丙酸 (Pentafluoropropionic acid)<sup>[28]</sup>; 衍生试剂 MSTFA (N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) 和 BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) (含 1%TMCS) 是比较常用的硅烷基化试剂。Zuo<sup>[29]</sup>, shareef 等<sup>[40]</sup>研究发现, 当选择乙酸乙酯、乙腈、二氯甲烷、吡啶和二甲基甲酰胺等试剂溶解分析物进行衍生实验时, 除了后两种溶剂, 其他的都会部分转化炔雌醇的衍生物为雌酮衍生物。进一步研究发现, 在反应温度不高于 60℃, 反应时间 30—60min 的条件下, BSTFA:TMCS:pyridine=49.5:0.5:50 时, 能够克服空间位阻的影响, 生成 di-TMS-EE2。衍生物在溶解试剂如乙酸乙酯里的不完全溶解, 也有可能造成低回收率<sup>[41]</sup>。研究报道称, 气谱中需要的衍生步骤耗费时间, 而且衍生物需要马上测定, 影响整个测定精确性和重现性<sup>[42]</sup>, 但是就两个方法总的可行性和重现性来说, 都能满足分析要求。而且基于气相色谱质谱的方法, 在分析时有比较完善的质谱数据库支持, 易于化合物鉴定<sup>[3]</sup>。

总体而言, 生物技术具有较好的灵敏度, 可以直接检测, 不需要复杂的前处理, 但是不能同时检测, 由于交叉反应, 给出的结果往往不够精确, 而且还会受抗血清或抗体的限制。对于色谱技术, 虽然没有生物方法灵敏, 但是可以同时检测多种物质, 而且定性定量方面更精确。液相色谱-质谱联用的方法, 相对气相色谱-质谱有优势, 不需要繁琐的衍生步骤, 因此大大减少了样品前处理的时间, 但是由于其价格昂贵, 不能在普通实验室普及。

### 3 展望与结论

由于雌激素和孕激素化合物的不稳定性, 从采样到实验室处理过程中存在很多不确定因素, 这就可能造成实验数据的不准确可靠。所以如果不能现场处理, 应该在有保护试剂存在的情况下低温避光运输样品, 尽快处理, 使降解带来的影响最小化。由于环境水体中雌激素和孕激素的含量大都在 ng/L 的水平, 而且环境基质复杂, 背景高, 因此为了达到检测废水中痕量激素物质需要的灵敏度和选择性, 对仪器的要求相当高。尽管已经有很多研究成功地用单极质谱分析这些化合物, 但是对于复杂水样, 有时不能很好地定性, 因此数据缺乏可靠性。

串联质谱无疑是目前比较优先的选择, GC-MS-MS 或者 LC-MS-MS 联用技术结合了色谱、质谱两者的优点, 将色谱的高分离性能和质谱的高鉴别特点相结合, 组成了较完美的现代分析技术。今后几年将继续使用这些先进技术, 结合完全自动的在线系统, 这将提高分析效率, 提高样品分析通量, 降低操作消耗和污染风险。但是其昂贵的价格, 暂时无法在很多实验室中普及。在这方面, 已经存在的或者不久的将来会出现的新的萃取技术和纯化技术, 比如基于在线或离线分子印记材料和免疫吸附柱, 还有各种制备色谱, 凝胶渗透色谱, 分子筛色谱, 也许会大大简化全部的分析步骤或者明显提高纯化效率。另外, UPLC 的普及使用, 也将是液相色谱一场新的技术革命。成倍地缩短样品检测时间, 从而更加适合

各种突发污染事件的快速分析检测的需要。现场分析方法的研究值得进一步深入发展, 能够使这类在水中不稳定化合物在短时间内得到有效处理, 成为今后方法研究的热点。

### 参考文献 (References)

- [1] Colburn T, Dumanoski D, Myers J P. Our stolen future [M]. New York: Dutton Press, 1996: 306.
- [2] Pelley J. Estrogen knocks out fish in whole-lake experiment [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(17): 313A-314A.
- [3] Kolodziej E P, Harter T, Sedlak D L. Dairy wastewater, aquaculture, and spawning fish as sources of steroid hormones in the aquatic environment [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38(23): 6377-6384.
- [4] Lee L S, Strock T J, Sarmah A K, et al. Sorption and dissipation of testosterone, estrogens, and their primary transformation products in soils and sediment[J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(18): 4098-4105.
- [5] Turan A. Excretion of natural and synthetic estrogens and their metabolites: Occurrence and behaviour in water [C]// Gies A ed. *Endocrinologically Active Chemicals in the Environment*. Berlin: Umweltbundesamt (German Environment Agency), 1996.
- [6] Yunho L, Beatei E, Ursvon G. Efficient removal of estrogenic activity during oxidative treatment of waters containing steroid estrogens environ [J]. *Sci Technol*, 2008, 42(17): 6333-6339.
- [7] Kuster M, Azevedo D A, López de Alda M J. Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil) [J]. *Environ International*, 2009, 35(7): 997-1003.
- [8] Labadie P, Budzinski H. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France)[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(14): 5113-5120.
- [9] Sarmah A K, Northcott G L, Leusch F D L, et al. A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand [J]. *Sci Total Environ*, 2006, 355(1-3): 135-144.
- [10] 黄斌, 刘晶靓, 高建培, 等. 水环境中类固醇类内分泌干扰物分析方法研究进展[J]. *环境科学导刊*, 2008, 27(5): 6-9.  
Huang Bin, Liu Jingliang, Gao Jianpei, et al. *Environmental Science Survey*, 2008, 27(5): 6-9.
- [11] Snyder S A, Keith T L, Verbrugge D A, et al. Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33(16): 2814-2820.
- [12] Belfroid A C, Van der Horst A, Vethaak A D, et al. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands [J]. *Sci Total Environ*, 1999, 225(1-2): 101-108.
- [13] Rodgers-Gray T P, Jobling S, Morris S, et al. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish [J]. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(8): 1521-1528.
- [14] Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, et al. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water[J]. *Environ Sci Technol*, 2000, 34(24): 5059-5066.
- [15] López de Alda M J, Barceló D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 892(1-2): 391-406.
- [16] Trevors J T. Sterilization and inhibition of microbial activity in soil[J]. *J*

- Microbiol Meth*, 1996, 26: 53–59.
- [17] Shore L S, Gurevitz M, Shemesh M. Estrogen as an environmental pollutant[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1993, 51: 361–366.
- [18] Desbrow C, Routledge E J, Brighty G C, et al. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. chemical fractionation and *in vitro* biological screening[J]. *Environ Sci Technol*, 1998, 32(11): 1549–1558.
- [19] Tabak H H, Bloomhuff R N, Bunch R L. Steroid hormones as water pollutants[J]. *Dev Ind Microbiol*, 1981, 22: 497–519
- [20] Huang C H, Sedlak David L. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2001, 20(1): 133–139.
- [21] Shore L S, Gurevitz M, Shemesh M. Estrogen as an environmental pollutant [J]. *Environ Contam Tox*, 1993, 51(3): 325–478.
- [22] Yang L H, Luan T G, Lan C Y. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1104(1–2): 23–32.
- [23] Wang L, Cai Y Q, He B, et al. Determination of estrogens in water by HPLC-UV using cloud point extraction[J]. *Talanta*, 2006, 70(1): 47–51.
- [24] López de Alda M J, Barceló D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection[J]. *J Chromatogr A*, 2001, 911(2): 203–210.
- [25] Kelly C. Analysis of steroids in environmental water samples using solid-phase extraction and ion-trap gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatog*, 2000, 872(1–2): 309–314.
- [26] Shishida K, Echigo S, Kosaka K. Evaluation of advanced sewage treatment processes for reuse of wastewater using bioassays [J]. *Environ Technol*, 2000, 21(5): 553–560.
- [27] Laganù A, Bacaloni A, Fago G, et al. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, 14(6): 401–407.
- [28] Johnson A C, Belfroid A, Corcia A D. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent [J]. *Sci Total Environ*, 2000, 256(2–3): 163–173.
- [29] Ternes T A, Stumpf M, Mueller J, et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants -I. Investigations in Germany, Canada and Brazil[J]. *Sci Total Environ*, 1999, 225(1–2): 81–90.
- [30] Kuch H M, Ballschmiter K. Determination of endogenous and exogenous estrogens in effluents from sewage treatment plants at the ng/L-level[J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, 366(4): 392–395.
- [31] 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]. *J Chromatogr A*, 2004, 1024(1–2): 177–185.
- [32] Braga O, Smythe G A, Schäfer A I, et al. Fate of steroid estrogens in Australian inland and coastal wastewater treatment plants[J]. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(9): 3351–3358.
- [33] Andersen H, Siegrist H, Halling-Sørensen B, et al. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(18): 4021–4026.
- [34] Tschmelak J, Proll G, Gauglitz G. Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example [J]. *Talanta*, 2005, 65(2), 313–323.
- [35] Shao B, Zhao R, Meng J, et al. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 548(1–2): 41–50.
- [36] Hu J Y, Zhang H F, Chang H. Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogra A*, 2005, 1070(1–2): 221–224.
- [37] Yamamoto A, Kakutani N, Yamamoto K, et al. Steroid hormone profiles of urban and Tidal Rivers using LC/MS/MS equipped with electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization sources [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40(13): 4132–4137.
- [38] Barber L B, Brown G K, Zaugg S D. Potential endocrine disrupting organic chemicals in treated municipal wastewater and river water[C]// Analysis of Environmental Endocrine Disruptors, ACS Symposium Series 747. Washington D C: American Chemical Society, 2000: 97–123.
- [39] Zuo Y G, Zhang K. Suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide as derivatization reagent for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1095(1–2): 201–202.
- [40] Shareef A, Angove M J, Wells J D. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyl)dimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1108(1): 121–128.
- [41] Mol H G J, Sunarto S, Steijger O M. Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert-butyl)dimethyltrifluoroacetamide using gas chromatography with mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 2000, 879(1): 97–112.

(责任编辑 岳臣)



## 《科技导报》“书评”栏目征稿

“书评”栏目发表图书评论文章,被评论的图书以高级科普、学术专著及科学文化图书为主,兼顾科学精神、科学方法、科技哲学、科学人文、科学家传记、经典科学著作、科学通俗读物、科学道德等内容的图书。欢迎投稿,择优刊登。每篇书评以2100字左右为宜,需配书影,并含书名、作者、出版单位、出版年份、定价等信息。栏目责任编辑:陈广仁,投稿邮箱:chenguangren@cast.org.cn。