

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2013.08.001

结合态雌激素的检测方法及污染现状*

朱 楦 贲伟伟 袁向娟 强志民**

(中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京, 100085)

摘 要 结合态雌激素是天然雌激素物质的一种重要赋存形态, 在环境中可水解为自由态, 产生内分泌干扰效应, 因此具有潜在的环境风险, 并且会影响天然雌激素污染调查和毒性评估的准确性. 本文详细探讨了结合态雌激素特定的化学结构对其检测、转化及环境风险等方面的影响, 对比分析了目前常用的几类检测方法的优缺点, 并初步总结了其在污水处理设施和环境水体中的污染浓度及归趋, 以期为我国开展相关研究工作提供参考.

关键词 内分泌干扰物, 结合态雌激素, 检测方法, 污染现状.

内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs) 作为一类新型微量污染物, 近年来对水环境安全提出了重大挑战^[1]. 这些物质通常在极低的环境赋存浓度下便具有内分泌干扰活性^[2], 会干扰野生鱼类与鸟类等体内的激素代谢过程, 降低生物的繁殖能力^[3], 甚至干扰某些植物固氮基因的表达, 降低植物的固氮效果^[4]. 我国有关 EDCs 的研究方兴未艾, 近年来各类 EDCs 在我国的环境水体、底泥和土壤中均被广泛检出, 引发了诸多思考和关注^[5-10]. 其中, 天然雌激素(Natural estrogens, 包括雌酮、雌二醇、雌三醇等) 由于其检出频率高、直接干扰效应强, 因而存在较高的生态风险^[11], 通常被作为一类主要的关注对象. 如高会等调查了大连地区环境水体中雌酮、雌二醇、雌三醇的含量, 检出浓度为 ND—100.6 ng·L⁻¹^[12].

然而, 天然雌激素在环境中除以自由态形式存在外, 结合态雌激素(Conjugated estrogen, CE) 也占有一定比例. 由于结合态水解后会转化为自由态, 若在调查天然雌激素时忽略结合态转化为自由态的效应, 将会导致调查结果中浓度变化的规律性差或出现处理设施对目标物去除效率为负等情况^[13]. 本文总结并探讨了国内外对于结合态雌激素的研究成果, 以期为我国开展环境中天然雌激素源解析、迁移转化规律及控制方面的研究工作提供参考.

1 结合态雌激素简介

1.1 化学结构

结合态雌激素(下简称 CE) 是生物体天然雌激素代谢循环中的一类主要代谢产物, 是在生物体内磺基转移酶(sulfotransferases) 和葡萄糖苷酸基转移酶(glucuronosyltransferase) 的作用下, 由自由态物质结构上的各羟基与硫酸盐或葡萄糖苷酸盐形成酯键而产生的, 如图 1 所示. 通常对于单羟基物质如雌酮(E1), 仅存在单一类型的结合态形式(如 E1-3G, 或 E1-3S); 而对于多羟基物质如雌二醇(E2) 等, 则可能出现一个或多个羟基形成不同酯键的情况(如 E2 可形成 E2-3S-17G、E2-3G-17S 等). 这给完整、精确定量 CE 造成了较大的困难, 也对其检测方法提出了更高的要求.

1.2 主要来源

CEs 一般通过人畜排泄物释放进入环境中. D'Ascenzo 等的采样分析显示, 处于正常生理循环的女性每天通过尿液排放的结合态形式的 E1、E2 和 E3 的量分别为 32、14、106 μg^[14]; 而 Johnson 等的调查显示, 女性每天排放的自由态 E1、E2 和 E3 依次为 8、3.5、4.8 μg^[15], 这证明人体每天排放的天然雌激素主要是以结合态形式存在的. 相比于人类, 畜禽的 CE 排放量通常更大. 据 Johnson 等计算, 一头奶牛

2012年11月20日收稿.

* 国家自然科学基金项目(21277160, 51138009); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2012ZX07313-001-07) 资助.

** 通讯联系人, Tel: 010-62849632; E-mail: qiangz@rcees.ac.cn

日排放天然雌激素总量可达 $15755 \mu\text{g}^{[16]}$; 而 Hoffmann 等的研究显示, 孕期牛体内天然雌激素主要以 E1-3S 和 β -E2-3G 的形式存在, 排出尿液中的 CE 含量较高^[17]. 因此, 可推断奶牛排放的大量天然雌激素中, CE 占有很大比重.

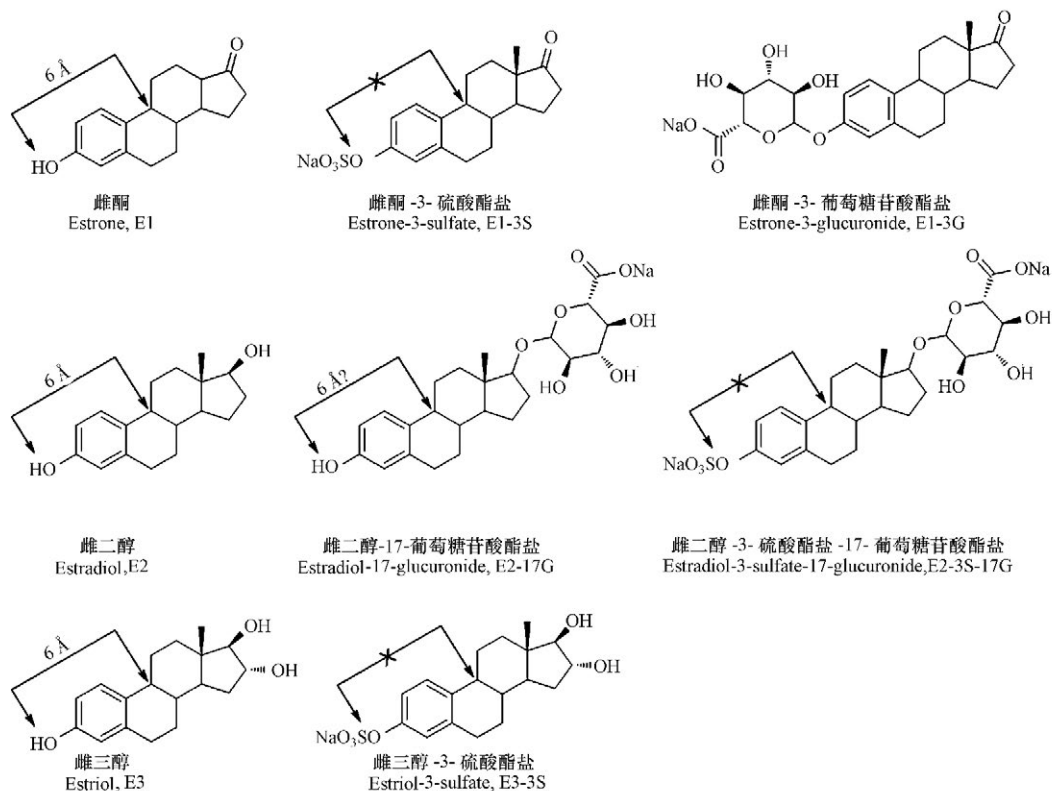


图 1 自由态和结合态雌激素的化学结构及 6 Å 活性基团示意图

Fig. 1 The chemical structures and 6 Å biophore of free and conjugated estrogens

污水处理厂、畜禽养殖厂作为人、畜排泄物的重要汇集地, 是 CE 进入环境的主要环节. 目前 CE 已经在相关水处理设施和环境水体中有了较为广泛的检出, 浓度水平最高可达 $200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上^[18], 其中以硫酸盐结合态物质为主.

1.3 结合态雌激素的环境风险

有研究认为, 自由态雌激素能够与靶细胞上的雌激素受体 (ER) 结合触发调节作用, 与其特定的酚羟基的化学结构有关 (如图 1 所示 6 Å 活性基团)^[19], 而 CE 中酯键的形成掩蔽了这一结构, 因此其主要的风险体现在酯键水解之后以自由态形式产生的直接内分泌干扰效应^[20]. Legler 等证实, 葡萄糖苷酸盐结合态和硫酸盐结合态可以被 β -葡萄糖苷酸酯酶 (β -glucuronidase) 或有活性的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 水解为自由态, 进而在体外细胞测试中显示出内分泌干扰活性^[21]. D'Ascenzo 等研究了 CE 在生活污水中的降解过程, 指出葡萄糖苷酸盐结合态仅能在污水中存留 24—30 h, 而硫酸盐结合态则在 60 h 之后才会慢慢衰减^[14], 这意味着一部分 CE 可能进入环境水体并逐步水解为自由态, 增加水体中自由态雌激素的含量.

另外, 对于某些 16 位、17 位酯化的结合态物质, 其 3 位酚羟基结构并未被掩蔽 (如图 1 所示 E2-17G), 因此其是否具有内分泌干扰活性还有待生物实验的验证.

2 结合态雌激素的检测方法

2.1 样品的前处理

环境样品中结合态雌激素的浓度较低, 一般在 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平, 且复杂的样品基质容易对仪器分析造成干扰, 因此有必要通过前处理步骤对目标物进行富集, 并对样品基质进行净化. 目前, 对于含 CE 的液体样品, 最为常用的前处理方式是固相萃取 (SPE). SPE 的溶剂用量少, 具有较好的杂质净化作用, 且可

以通过选择更为广谱的固相萃取柱,在一次上样过程中同步富集结合态和自由态样品以减少取样量和前处理时间。Suri 等试验了 6 种 C-18 硅胶小柱对于天然雌激素的富集效果,发现 Varian Bond Elut C-18 柱富集结合态与自由态时均有接近 80% 的回收率; Supelco DSC-18 柱对自由态富集回收率超过 90%,但对结合态仅有 60%。另外,苯基和丁腈基小柱仅对结合态有富集效果,但回收率均低于 20%^[22]。Hutchins 等使用 CarboapakX 石墨化碳黑柱对多种 CE_s 进行固相萃取,回收率波动较大,为 35%—271%^[23]。在 CE_s 的样品富集中,Oasis HLB 亲水-亲脂平衡性小柱应用最为广泛,Dutta 等应用 HLB 小柱富集污水处理厂进出水和地表水中的 CE_s,回收率在 88%—138%^[24]。当 CE_s 被萃取柱捕获之后,可以利用其与杂质极性、有机/水溶剂中分配性质等的差异,先使用其他不会洗脱目标物的溶剂进行清洗以去除杂质,之后再再将目标物洗脱下来。如 Suri 等用水/甲醇(60/40,V/V)清洗小柱两次后再用甲醇对 CE_s 进行洗脱,证明清洗造成的目标物损失可以忽略^[22]。

针对含 CE_s 的固态样品,通常采用加速溶剂萃取法(Accelerated solvent extraction,ASE)来提取样品中的目标物^[25]。Bevacqua 等使用 ASE 方法提取污泥和禽畜粪便样品中的 CE_s,并通过氧化铝进行净化后浓缩富集,在未进行 SPE 的情况下,对 E1-3S 等 3 种硫酸盐结合态达到了 85%—109% 的回收率^[26]。Fernandez 等指出,采用弗罗里硅土(Florisil,主要成分为硅酸镁)对 ASE 提取液进行净化,可以很好地去除样品中的大部分杂质,从而降低由基质干扰所导致的质谱离子化问题;他们同时对提取条件进行了优化,发现在 75 °C 下使用 30:70 的甲醇:二氯甲烷溶液(V/V)作为提取液效果较好,而更高的温度(110 °C)或更高的二氯甲烷比例(90%)都会导致目标物提取效果变差^[18]。

2.2 生物学方法

目前,生物学方法已广泛应用于自由态物质含量及其效应的检测^[27]。酵母菌雌激素筛检技术(YES)、乳腺癌细胞雌激素筛检技术(E-Screen)、卵黄蛋白原酶联免疫(VTG-ELISA)^[28]等方法可以通过雌二醇活性当量(EEQ)或 VTG 蛋白含量表征出目标物的干扰活性,检测通量也较大。而 ELISA 法也可以直接检测自由态物质的含量,且由于该方法中受体与目标物属特异性结合,一些样品前处理净化步骤可以省略。在检测灵敏度上,一些成熟的试剂盒已经可以达到痕量检测标准。如 Swart 等使用 IBL 公司免雌酮 ELISA 试剂盒检测环境水样中的 E1、E2 和 E3 的浓度,检测限为 10 ng·L⁻¹,交叉反应率低于 2%^[29];马军等通过固相萃取,采用酵母双杂交法测定污水样品的雌二醇当量活性(EEQ),检测限低于 3.37 ng·L⁻¹^[30]。

但是,由于 CE_s 不具有直接生物活性,因此上述大部分体外检测方法都无法直接对 CE_s 进行定量或干扰活性评价^[31-32],而是需要采用酶先将样品中的 CE_s 水解为自由态,之后再进行检测。生物体内试验对 CE_s 的响应尚未见报道,但由于 CE_s 本身就大量存在于生物激素代谢循环中^[20,33],生物体具有水解它们的能力,因此或许可推断体内试验能反映出外源 CE_s 的影响,而不需要额外的水解过程。

2.3 色谱学检测方法

色谱学方法是目前最为常用的 CE_s 分析方法,其应用已有超过 30 年的历史。早期主要用于分析药物有效成分或人及动物尿液中的 CE_s 含量等,由于样品中 CE_s 赋存浓度较高(mg·L⁻¹级别),所以采用 UV、DAD、荧光、氢火焰等检测器便可达到定量要求。Novakovic 等使用 HPLC-UV 检测药物中的 CE_s,检测限为 4 mg·L⁻¹^[34];Gatti 等使用 HPLC-FLD 分析了制药用孕马尿中的结合态雌酮(E1-3S),检测限为 0.19 pmol^[35]。而在对环境样品中 CE_s 进行定量时,通常需要采用灵敏度更高的检测器,如一级质谱或二级质谱进行定性与定量。

2.3.1 气相色谱-质谱方法

气相色谱主要利用目标物的沸点、极性、吸附性质的差异来实现混合组分的分离,可以有效避免基质中的惰性物质与难挥发性物质的干扰,因此在分析复杂基质样品(如污水、污泥、土壤等)时具有一定的优势。但对于检测极性、挥发性差的化合物具有一定局限性,通常需要对目标物进行衍生化处理,衍生化效果将直接关系到定量分析的准确性、灵敏度和稳定性^[36]。CE_s 的极性较强,且可以与衍生化试剂反应,各羟基基团多被硫酸盐等基团以酯键形式占据,如图 2 所示,导致其无法被正常衍生化,从而难以被 GC-MS 所检测。因此,在使用气相方法时,需要先对酯键进行水解,使其转化为自由态,之后再行衍生化^[37-38]。

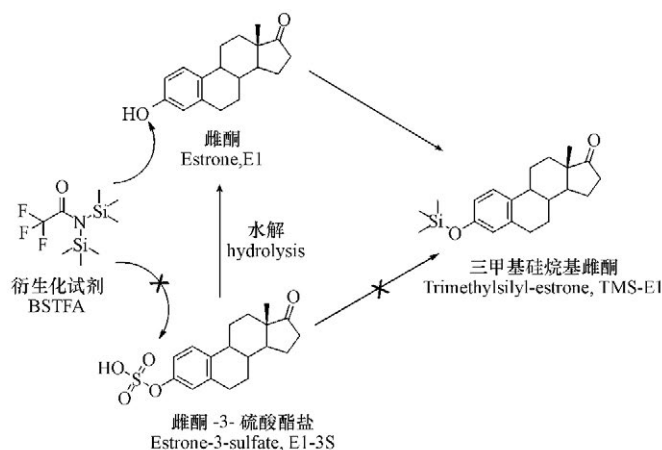


图2 结合态雌激素的酯键水解与衍生化过程示意图(以 E1-3S 为例)

Fig. 2 The hydrolysis and derivatization of conjugated estrogens (taking E1-3S as example)

目前常见的水解方法包括酶法、酸法等。Belfroid 等使用 β -葡萄糖苷酸酯酶(β -glucuronidase) 水解结合态 E2, 之后再行衍生化及 GC-MS 检测, 得到了 $59\% \pm 3\%$ 的回收率^[39]。Mouatassim-Souali 等同样使用 β -葡萄糖苷酸酯酶, 并改进了 SPE 方法和酶解条件, 在纯水和污水中的回收率分别达到了 90% 和 80% 以上^[40]。但由于从罗曼蜗牛体内提取的该酶掺杂有具硫酸酯盐水解活性的物质, 因而只能得到某种物质(如 E1) 的总结合态物质含量, 无法进一步划分是 E1-3G 还是 E1-3S。Liu 等使用芳香基硫酸酯酶(arylsulfatase) 和 β -葡萄糖苷酸酯酶分别对样品进行水解, 以区分不同结合态形式, 在纯水中得到 57.3%—114.4% 的回收率, 但在污水中葡萄糖苷酸结合态物质回收率显著变低, E2-3G 仅为 30%^[41]。酸催化法也被广泛应用于结合态特别是硫酸盐结合态的水解过程^[42-44]。Liu 等将乙酰氯加入甲醇制备无水 HCl, 并用乙酸乙酯定容至 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 用于催化结合态雌激素的水解, 在 80°C 下反应 120min, 对于葡萄糖苷酸盐结合态有超过 86.7% 的平均水解效率, 而对硫酸盐结合态的水解效率接近 100%^[45]。

自由态雌激素的检测已有很多文献报道。LaFleur 等总结了前人工作, 指出样品净化-衍生化-GC/MS 检测是最为广泛使用的自由态检测方法, 对于地表水和污水样品 GC-MS 及 GC-MS/MS 的检测限(LOD) 通常可达 $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下; 对于污泥样品, 通常可达 $1-5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ ^[36]。二级质谱(MS/MS) 检测沉积物灵敏度较单级质谱有所提高, 但检测污泥时提升不大^[46]。Hernando 等的试验表明, 在检测污水处理厂进出水时, 去掉净化步骤后 GC-MS 的 LOD 会上升至 $4.0-17.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右, 而去掉衍生化步骤即使使用 GC-MS/MS, LOD 也仅可达到 $7.5-27.5 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[47]。因此, 尽管净化和衍生化步骤繁琐费时, 却是必不可少的。而将结合态水解与自由态检测相串联时, 通常还需要在水解步骤后加入一个额外的 SPE 步骤来重新富集自由态^[45], 这使得气相色谱法检测结合态物质的过程较为复杂, 引入的不稳定因素较多, 从一定程度上削弱了其抗干扰能力强的优势。

2.3.2 液相色谱-质谱方法

近年来, 液相色谱-质谱(LC-MS、LC-MS/MS) 检测技术获得了快速发展, 相比于气相色谱法, 它省略了衍生化步骤, 并可实现自由态与结合态形式的直接同步检测。表 1 列举了使用 LC-MS/MS 检测不同样品中结合态雌激素的基本参数。不同文献中报道的色谱柱、流动相等条件较为接近, 但定量限(LOQ) 存在较大差异, 如 Tso 开发了市售牛奶中 CEs 的检测方法, 定量限为 $20-100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[48], Kumar 等使用 UPLC-MS/MS 检测污水处理厂进出水中的 CEs, 定量限为 $0.2-0.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[49]。这一方面与样品基质的复杂性有关; 另一方面也是因为采用了不同的定量限定义。文献报道的定量限通常分为仪器定量限和方法定量限两类, 其中前者仅评价从色谱进样开始的检测精度, 而后者通常将预处理过程的富集效果也纳入考虑范围。由于在不同的检测方法中“进样量”并非一个固定数值(以 UPLC-MS/MS 为例, 进样量通常可选在 $1-20 \mu\text{L}$ 之间), 因此实际进入检测器的目标物总量也因方法而异, 这样的差别在计算仪器定量限时并不能被有效排除; 而富集倍数的不同也导致方法定量限产生差异。

表 1 摇结合态雌激素的液相色谱-质谱检测方法

仪器类型	色谱柱	流动相	样品基质	前处理过程	目标物 ^a	定量限 (LOQ)	回收率/%	参考文献
HPLC-ESI-MS/MS	XterraC18 柱 (2.1 mm × 150 mm, 5.0 μm 填料)	水/乙腈, 添加 0.1% 氨水	干燥污泥, 养鸡 场粪便	加速溶剂萃取, 氧化铝净化	E1-3S, E2-3S, E2-17S	5 ng·g ⁻¹	85—109	[26]
UPLC-ESI-MS/MS	ACQUITYBEHC18 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm 填料)	水/乙腈	污水处理厂进/ 出水, 河水	HLB 固相萃取, NH ₂ 柱净化	E1-3S, E2-3S, E3-3S, E1-3G, E2- 3G, E3-3G	0.2—0.8 ng·L ⁻¹	38—127	[49]
HPLC-ESI-MS/MS	BetabasicC18 柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.0 μm 填料)	水/乙腈/甲醇, 添加 5.0 mmol 氨水	市售牛奶	HLB 固相萃取, NH ₂ 柱净化	E1-3S, E2-3S, E3-3S, E2-17S, E1-3G, E2-3G, EE2-3G, E2-3G- 17G, E2-3G-17S, E2-3S-17S	20—100 ng·L ⁻¹	62—112	[48]
HPLC-ESI-MS-MS	ZorbaxExtendC18 柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm 填料)	水/乙腈, 添加 13.5 mmol 氨水	污水处理厂进/ 出水, 河水	HLB 固相萃取, 弱阴离子交换 柱净化	E1-3S, E2-3S, E2-17S, E1-3G, E2-3G, E2-17G	检测限 (LOD): 0.03—0.08 ng·L ^{-1b}	62—81 ^b	[52]
HPLC-ESI-MS-MS	BetabasicC18 柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.0 μm 填料)	水/乙腈/甲醇, 添加 5.0 mmol 氨水	施用过粪肥的 土地地表径流	HLB 固相萃取	E1-3S, E2-3S, E3-3S, E2-17S, E1-3G, E2-3G	仪器定量限 ^c : 1 μg·L ⁻¹	88—138	[24]
HPLC-ESI-MS-MS	Kromasil 100 C18 柱 (4.6 × 25 mm, 5.0 μm 填料)	水/乙腈, 添加 乙酸 (pH = 2.8)	污水处理厂进/ 出水, 河水	ENVI-CARB 柱 固相萃取	E1-3S, E2-3S, E1-3G, E2-17G, E2-17A	1—30 ng·L ⁻¹	23—87	[56]
HPLC-ESI-MS-MS	XbridgeC18 柱 (2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm 填料)	水/乙腈, 添加 25 mmol 甲酸	养殖场厌氧塘 污水	CarbopackX 活性 碳柱固相萃取	E1-3S, E2-3S, E3-3S, E2-17S, E1-3G, E2-3G, E3-3G, E2-17G, E2-3G-17S, E2-3S-17G, E2-3-17- DS, E2-3-17-DG	未报道	35—271	[23]

摇注: a: 仅列出了目标物中属结合态雌激素类的物质; b: 文中仅给出了超纯水水中的检测限和回收率; c: 不考虑 SPE 过程对样品的富集浓缩效果, 此处指富集后的浓度。

电喷雾电离源(ESI) 是进行质谱检测时较为通用的离子源. 使用 ESI 源时, 母离子可直接由分子结构和分子量推测(负源模式下多为失去一个质子). 在生成子离子时, 硫酸盐结合态物质中硫酸根脱去, 形成 m/z 为 80 的碎片和自由态碎片; 3 位酯化的葡萄糖苷酸结合态物质也脱去酯化基团形成 m/z 为 113 的碎片和自由态碎片; 而 16 位和 17 位酯化的葡萄糖苷酸结合态物质则倾向于产生 m/z 为 85 的碎片^[50].

相比于气相色谱法, 液相色谱更易受到非挥发性基质的干扰, 在检测复杂基质样品时其分析灵敏度会降低^[51]. 有研究表明, SPE 过程中共洗出的杂质会抑制质谱离子源处的离子化效率 10%—90%^[52-53]. Gomes 等对比了 LC-MS 与 GC-MS 检测活性污泥和底泥样品中天然雌激素的效果, 指出 LC-MS 进行定量分析时, 样品基质干扰明显大于 GC-MS, 方法回收率很低^[54]. 虽然使用二级质谱检测可以一定程度上提高选择性, 使得相同分子量或类似化学性质的杂质导致的基线升高、假阳性等情况得到较大改观, 但电离抑制导致的响应信号低、检测限高的问题仍较难避免. 在检测样品时加入内标物, 采用内标法进行定量, 可有效提高方法回收率, 但结合态雌激素的内标物价格昂贵. 因此对于环境样品中 CE_s 的液相色谱法检测, 关键在于优化前处理步骤以尽可能实现样品净化.

另外, 一些其他色谱学方法如毛细管电泳-飞行时间质谱(CE-TOF/MS) 等方法也被用于结合态与自由态物质的同步检测, 虽得到了较好的分离度和抗基质干扰能力, 但检测精度尚待提升^[55].

3 结合态雌激素的污染现状

3.1 城市污水处理厂

表 2 总结了国外一些污水处理厂进出水的调查数据. 可以看出, CE_s 广泛存在于进水之中, 但不同污水处理厂进水中 CE_s 所占天然雌激素比例有较大差异. D'Ascenzo 等人的研究证实了 CE_s 在下水井和污水管网中的水解现象, 指出葡萄糖苷酸结合态物质水解较快; 而由于相应降解酶的缺乏导致硫酸盐结合态物质的水解速度较慢^[14]. Gabet-Giraud 等人的研究指出仅有不足 16% 的天然雌激素以结合态形式存在于污水处理厂进水中, 也说明结合态物质可能在污水管网中发生了水解^[57]. 但也有文献报道污水厂进水中的结合态 E2 和 E1 分别达到了 50% 和 58%^[58]. 这说明结合态的水解过程与程度随环境(如在管网中的停留时间、微生物种群等) 变化很大, 应视具体情况而定.

表 2 结合态雌激素在污水处理厂进出水中的浓度

Table 2 Concentrations of conjugated estrogens in the influent and effluent of sewage treatment plants

地点	结合态种类	(进水浓度/出水浓度) / (ng·L ⁻¹)	去除率 / %	进/出水结合态所占比例	文献来源
日本东京、大阪地区	E1-3S	18.0/11.8	34.4	进水:	[49]
	E2-3S	3.6/0.4	88.9	1.6%—44.3%	
	E3-3S	1.1/0.3	72.7	出水:	
	E2-3G	8.1/n. d. ^a	100	8.5%—100%	
日本大阪地区	E1-3S	8.2/1.3	84.1	进水:	[41]
	E3-3S	21.9/n. d.	100%	40.7%—100%	
	E1-3G	3.2/1.4	56.2	出水: 0—5.8%	
法国 14 家污水处理厂平均	E1 结合态 ^b	7.6/1.4	81.6	进水:	[57]
	α -E2 结合态	0.6/0.9	-50% ^b	5.1%—13.9%	
	β -E2 结合态	3.3/0.3	90.9%	出水:	
	E3 结合态	16/8.9	44.4	7.1%—26.6%	
美国纽约地区活性污泥	E1-3S	34.1/0.29	99.1	进水:	[52]
	E2-3S	3.2/n. d.	100	31.2%—58.9%	
	E1-3G	0.4/n. d.	100	出水:	
	E2-3G	0.3/n. d.	100	0%—28.7%	

注: a: n. d. 为未检出, 计算时取为 0; b: 文献报道了 E1 的自由态和总浓度, 结合态浓度由此推算; α -E2、 β -E2、E3 的结合态浓度同样计算. 另外, 由于 14 家污水处理厂中存在一些未检出现象, 因此计算平均值时或存在一定偏差.

由于酯盐基团的存在, 结合态雌激素的 $\lg K_{ow}$ 值通常较低(如 E1-3S, 美国 EPA 网站提供的 EPI 软件

计算其 $\lg K_{ow}$ 仅为 0.95^[59]), 在进入活性污泥处理体系后仍倾向于存留在水相中. Chen 等研究了 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 E1-3S 和 E2-3S 向失活污泥的吸附过程, 指出在 pH 值为 7 时吸附率分别为 30% 和 50%^[60]. 如本文 1.3 节所述, CE 的主要环境风险在于水解为自由态. 而污泥中微生物表面或胞内水解产生的自由态物质因其亲脂性倾向于吸附在污泥表面或存留在微生物细胞内, 危害较小; 相反, 水相中的水解则会直接导致处理体系中自由态物质浓度的上升. 因此, 了解 CE 在两相中的分配, 对于体系中雌激素类物质的总量衡算以及评估 CE 产生的风险十分关键.

目前对于污水处理厂中 CE 的去 除研究仍多停留在表观去除率上, 通常认为, 被去除的结合态物质均转化为自由态物质^[14]. 根据出水浓度数据分析, 尽管部分 CE (如 E2-3G 等) 有较高的去除效率 (主要归因于体系中葡萄糖苷酸酶的水解作用^[61]), 但出水中仍存在部分难去除的物质 (如 E1-3S). 由于酯键的存在, 微生物对结合态的降解过程并不能完全遵照自由态雌激素的降解过程来推断. 如 Lee 等报道了活性污泥对自由态 E2 的降解过程, 指出 E2 首先被氧化为 E1, 然后于 16 位 C 处被氧化开环^[62]. 对于 17 位被硫酸酯盐结合的 E2-17S 等物质而言, 这一降解途径很可能被阻断; 而对于 3 位结合的 E2-3S 而言, 由于分子结构与 E2 不同, 降解途径尚不清楚. 若经证实 E1-3S、E2-3S 等较难水解的 CE 可以不经水解而直接被降解, 则可能会为 CE 提出一条新的归趋途径.

3.2 集约化畜禽养殖厂

畜禽养殖厂排放的结合态物质通常进入内部的水处理设施如氧化塘或厌氧塘中. Hutchins 等对美国中南部 8 座养殖厂的调查结果显示, 奶牛舍产生的废水中 E1-3S、 β -E2-3S、 α -E2-3S 浓度分别为 87.0、42.0、170 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 而猪舍废水和禽舍废水中的浓度较低, E1-3S 仅分别为 1.8 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.9 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. 值得注意的是, 在禽舍废水中检测到的 CE 总浓度 (通过结合态水解反应后测量自由态总浓度, 减去原有自由态雌激素浓度) 与 12 种目标 CE 检出浓度之和相比要高很多, 说明仍存在一些未被鉴定出种类的结合态物质^[23]. Bevacqua 等调查了美国 12 个农场中禽类粪便中的 CE, 发现 E1-3S 含量达 19.2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 干重^[26]. 畜禽排泄物中的微量污染物会随着施肥过程迁移到农田土壤及水体中, 因此其中残留的 CE 也随之在环境中迁移甚至累积. Shrestha 等指出, E2-3G 在土壤中的存留时间可达 1—14 d, 且降解速度随土壤深度增加而变慢^[63]. Dutta 等调查了施用禽畜粪便作为肥料的土壤地表径流中的 EDCs 含量, 发现在施用粪肥后的几次降雨过程中, 地表径流中 E2-17S 的含量达到 0.3—3.9 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 每公顷净输出量最高达 100 μg ^[24].

3.3 地表与地下水体

地表水是污水处理厂、畜禽养殖厂出水排放的直接受体, 且地表水中的 EDCs 易与野生生物接触进而产生内分泌干扰效应. 而 CE 进入地表水体后, 因其水溶性好、生物活性较弱的特点, 往往能存留较长的时间. Rodriguez 等在巴萨罗那附近的河流中检测到 6 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右的 E1-3S, 且在不同月份中相对稳定^[64]; Isobe 等人对日本河流和湖泊的调查显示, 有 0.2—0.9 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 E1-3S 和 E2-3S 被检出^[65].

地下水往往是 CE 污染的间接受体. Alder 等调查了德国污水处理厂下游地下水中的天然雌激素浓度, 经过结合态水解后, 有微量 E1 被检出, 证明地下水含有微量的结合态 E1^[58]; 而 Shrestha 等调查了某养猪场附近 6.1—8.0 m 深处地下水中的 E2-3G, 发现浓度达 425 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[63]. 这些数据表明畜禽养殖排放的废水与粪便对地下水有较为严重的污染. 目前, 我国天然水体中 CE 的含量检测仍鲜有报道, 在这方面的研究亟待加强.

4 结论和建议

结合态雌激素 (CE) 是天然雌激素物质的一种重要存在形式, 目前已经在相关污水处理设施中有了较为广泛的检出. 这些物质容易在水相中赋存, 进入环境后存留时间较长, 且在环境中会被微生物逐渐水解为自由态, 进而产生内分泌干扰效应, 因此具有潜在的环境风险.

针对上述问题, 对环境中结合态雌激素的研究应关注以下几个方面:

(1) 检测方法的改进: 对于污水、沉积物、活性污泥等复杂基质, 需要强化前处理过程的净化效果, 或采用在线 SPE-衍生化等模式化方法以稳定气相、生物等方法中复杂的前处理步骤所带来的扰动.

(2) 行为、归趋的研究: 对于 CE 在污水处理工艺中的迁移转化还需深入研究, 包括其在污水、污泥

两相上的吸附和分配过程,以及最终归趋.这对全面、准确评估 E1、E2 等雌激素的环境残留浓度、预测相关生态风险十分必要.

参 考 文 献

- [1] Schwarzenbach R P, Escher B I, Fenner K, et al. The challenge of micropollutants in aquatic systems [J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1072-1077
- [2] Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, et al. Endocrine disruptors in the environment-(IUPAC Technical Report) [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2003, 75(5): 631-681
- [3] Colborn T, Saal F S V, Soto A M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1993, 101(5): 378-384
- [4] Fox J E, Starcevic M, Jones P E, et al. Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(6): 672-677
- [5] Wang L, Ying G G, Chen F, et al. Monitoring of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of the Yellow River in China using combined chemical and biological tools [J]. *Environmental Pollution*, 2012, 165: 241-249
- [6] Xia X H, Yang L Y, Bu Q W, et al. Levels, Distribution, and health risk of phthalate esters in urban soils of Beijing, China [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2011, 40(5): 1643-1651
- [7] Zhao J L, Ying G G, Wang L, et al. Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in surface water of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(2): 962-974
- [8] Peng X Z, Yu Y J, Tang C M, et al. Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China [J]. *Science of the Total Environment*, 2008, 397(1/3): 158-166
- [9] 李洋, 胡雪峰, 王效举, 等. 苏州河底泥 3 种内分泌干扰物的空间分布及环境风险 [J]. *环境科学*, 2012, 33(01): 239-246
- [10] 龚剑, 冉勇, 杨余, 等. 珠江广州河段表层水中雌激素化合物的污染状况 [J]. *环境化学*, 2011, 27(2): 242-244
- [11] 隋倩, 黄俊, 余刚. 中国城市污水处理厂内分泌干扰物控制优先性分析 [J]. *环境科学*, 2009, 30(02): 384-390
- [12] 高会, 那广水, 方小丹, 等. 大连地区环境水体中六种雌激素的残留特征及随季节变化情况 [J]. *环境化学*, 2011, 30(12): 2041-2046
- [13] 聂亚峰, 强志民, 张鹤清, 等. 内分泌干扰物在城市污水处理厂中的行为和归趋: 综述 [J]. *环境科学学报*, 2011, 31(07): 1352-1362
- [14] D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, et al. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities [J]. *Science of the Total Environment*, 2003, 302(1/3): 199-209
- [15] Johnson A C, Sumpter J P. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(24): 4697-4703
- [16] Johnson A C, Williams R J, Matthiessen P. The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study [J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 362(1/3): 166-178
- [17] Hoffmann B, dePinho T G, Schuler G. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy [J]. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 1997, 105(5): 296-303
- [18] Fernandez M P, Noguerol T N, Lacorte S, et al. Toxicity identification fractionation of environmental estrogens in waste water and sludge using gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry and recombinant yeast assay [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(3): 957-968
- [19] Jason W B, John N L. Endocrine disruptors in wastewater and sludge treatment processes [M]. America: CRC Press Company, 2003: 9-22
- [20] Harris R M, Waring R H, Kirk C J, et al. Sulfation of "estrogenic" alkylphenols and 17 beta-estradiol by human platelet phenol sulfotransferases [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(1): 159-166
- [21] Legler J, Jonas A, Lahr J, et al. Biological measurement of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the *in vitro* ER-CALUX reporter gene assay [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21(3): 473-479
- [22] Suri R P S, Singh T S, Chimchirian R F. Effect of process conditions on the analysis of free and conjugated estrogen hormones by solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPE-GC/MS) [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184(3): 1657-1669
- [23] Hutchins S R, White M V, Hudson F M, et al. Analysis of lagoon samples from different concentrated animal feeding operations (CAFOs) for estrogens and estrogen conjugates [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(3): 738-744
- [24] Dutta S, Inamdar S, Tso J, et al. Free and conjugated estrogen exports in surface-runoff from poultry litter-amended soil [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2010, 39(5): 1688-1698
- [25] Takigami H, Taniguchi N, Matsuda T, et al. The fate and behaviour of human estrogens in a night soil treatment process [J]. *Water Science and Technology*, 2000, 42(7/8): 45-51

- [26] 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(11): 2120-2126
- [27] 张静云, 吕剑, 何义亮, 等. 环境雌激素的生物检测与应用 [J]. *环境科学与技术*, 2007, 30(2): 100-102
- [28] Harries J E, Sheahan D A, Jobling S, et al. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16(3): 534-542
- [29] Swart N, Pool E. Rapid detection of selected steroid hormones from sewage effluents using an ELISA in the Kuils River water catchment area, South Africa [J]. *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 2007, 28(4): 395-408
- [30] 马军, 文刚, 邵晓玲. 城市污水处理厂各工艺阶段内分泌干扰物活性变化规律研究 [J]. *环境科学学报*, 2009, 29(1): 63-67
- [31] Swart J C, Pool E J, van Wyk J H. The implementation of a battery of *in vivo* and *in vitro* bioassays to assess river water for estrogenic endocrine disrupting chemicals [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(1): 138-143
- [32] Soto A M, Calabro J M, Precht N V, et al. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska, USA [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(3): 346-352
- [33] 伍吉云, 万祎, 胡建英. 环境中内分泌干扰物的作用机制 [J]. *环境与健康杂志*, 2005, 22(6): 95-98
- [34] Novakovic J, Tvrzicka E, Pacakova V. High-Performance liquid-chromatographic determination of equine estrogens with ultraviolet absorbency and electrochemical detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 1994, 678(2): 359-363
- [35] Gatti R, Gotti R, Gioia M G, et al. HPLC analysis of pharmaceutical estrogens in raw materials and dosage forms [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 17(2): 337-347
- [36] LaFleur A D, Schug K A. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 696(1/2): 6-26
- [37] Masse R, Ayotte C, Dugal R. Studies on anabolic-steroids: 1. Integrated methodological approach to the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of anabolic-steroid metabolites in urine [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1989, 489(1): 23-50
- [38] Schanzer W, Donike M. Metabolism of anabolic-steroids in man-synthesis and use of reference substances for identification of anabolic-steroid metabolites [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 275(1/2): 23-48
- [39] 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]. *Science of the Total Environment*, 1999, 225(1/2): 101-108
- [40] Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S L, Perdiz D, et al. Validation of a quantitative assay using GC/MS for trace determination of free and conjugated estrogens in environmental water samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2003, 26(1/2): 105-111
- [41] Liu Z H, Hashimoto T, Okumura Y, et al. Simultaneous analysis of natural free estrogens and their conjugates in wastewater by GC-MS [J]. *CLEAN-Soil, Air, Water*, 2010, 38(2): 181-188
- [42] 汪洁, 胡建国, 李建华. 硅烷化气相色谱法测定注射用倍美力和倍美力软膏中结合态雌激素 [J]. *药物分析杂志*, 2001, 21(1): 18-21
- [43] Tang P W, Crone D L. A new method for hydrolyzing sulfate and glucuronyl conjugates of steroids [J]. *Analytical Biochemistry*, 1989, 182(2): 289-294
- [44] Burstein S, Lieberman S. Hydrolysis of ketosteroid hydrogen sulfates by solvolysis procedures [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1958, 233(2): 331-335
- [45] Liu Z H, Kanjo Y, Mizutani S. Deconjugation characteristics of natural estrogen conjugates by acid-catalyzed solvolysis and its application for wastewater samples [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2010, 12(8): 1594-1600
- [46] Gabet V, Miegé C, Bados P, et al. Analysis of estrogens in environmental matrices [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(11): 1113-1131
- [47] Hernando M D, Mezcuca M, Gomez M J, et al. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters [J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1047(1): 129-135
- [48] Tso J, Aga D S. A systematic investigation to optimize simultaneous extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of estrogens and their conjugated metabolites in milk [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(29): 4784-4795
- [49] Kumar V, Nakada N, Yasojima M, et al. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(10): 1440-1446
- [50] de Alda M J L, Diaz-Cruz S, Petrovic M, et al. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000(1/2): 503-526
- [51] Reemtsma T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants [J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000(1/2): 477-501
- [52] Reddy S, Iden C R, Brownawell B J. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(21): 7032-7038

- [53] Miege C , Bados P , Brosse C , et al. Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* , 2009 , 28(2) : 237-244
- [54] Gomes R L , Avcioglu E , Scrimshaw M D , et al. Steroid estrogen determination in sediment and sewage sludge: A critique of sample preparation and chromatographic/mass spectrometry considerations , incorporating a case study in method development [J]. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* , 2004 , 23(10/11) : 737-744
- [55] Kuehnbaum N L , Britz-McKibbin P. Comprehensive profiling of free and conjugated estrogens by capillary electrophoresis-time of flight/mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry* , 2011 , 83(21) : 8063-8068
- [56] Pedrouzo M , Borrull F , Pocurull E , et al. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta* , 2009 , 78(4/5) : 1327-1331
- [57] Gabet-Giraud V , Miege C , Choubert J M , et al. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants [J]. *Science of the Total Environment* , 2010 , 408(19) : 4257-4269
- [58] Adler P , Steger-Hartmann T , Kalbfus W. Distribution of natural and synthetic estrogenic steroid hormones in water samples from Southern and Middle Germany [J]. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* , 2001 , 29(4) : 227-241
- [59] Potter B B , Wimsatt J C. USEPA method 415.3: Quantifying TOG , DOG , and SUVA [J]. *Journal American Water Works Association* , 2012 , 104(6) : 37-38
- [60] Chen X , Hu J Y. Adsorption of natural estrogens and their conjugates by activated sludge [J]. *Water Air and Soil Pollution* , 2010 , 206(1/4) : 251-261
- [61] 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]. *Science of the Total Environment* , 1999 , 225(1/2) : 81-90
- [62] Lee H B , Liu D. Degradation of 17 beta-estradiol and its metabolites by sewage bacteria [J]. *Water Air and Soil Pollution* , 2002 , 134(1/4) : 353-368
- [63] 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(20) : 11047-11053
- [64] Rodriguez-Mozaz S , de Alda M J L , Barcelo D. Monitoring of estrogens , pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A* , 2004 , 1045(1/2) : 85-92
- [65] Isobe T , Shiraishi H , Yasuda M , et al. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A* , 2003 , 984(2) : 195-202

Detection methods and contamination status of conjugated estrogens

ZHU Bing BEN Weiwei YUAN Xiangjuan QIANG Zhimin*

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

ABSTRACT

Conjugated estrogens (CEs) are an important existing form of natural estrogens. They can hydrolyze to free forms in the environment and subsequently induce endocrine disrupting effects , thus not only causing potential environmental risks but also interfering with the accuracy of pollution survey and toxicity assessment of natural estrogens. We discuss in detail the influences of the specific chemical structures of CEs on their detection , transformation and environmental risk , and compares the strength and weakness of several commonly-used detection methods. We also summarizes the occurrence and fate of CEs in wastewater treatment facilities and natural waters , so as to provide references for relevant studies in China.

Keywords: endocrine disrupting chemicals , conjugated estrogens , detection method , pollution status.