

# Analysis Methodologies of Environmental Estrogen in Solid Matrices

Wei Han<sup>1</sup>, Ming Yang<sup>1</sup>, Yanxia Li<sup>1\*</sup>, Wei Li<sup>2</sup>, Chaozi Liao<sup>3</sup>, Xiong Xiong<sup>2</sup>, Fengsong Zhang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Water Environment Simulation, School of Environment, Beijing Normal University, Beijing 100875, China;

<sup>2</sup>Institute of Geographical Sciences and Natural Resources Research, CAS, Beijing 100101, China;

<sup>3</sup>Center for Agro-Food Quality Safety, Ministry of Agriculture of China, Beijing 100081, China

\*Corresponding author, Email: liyxbnu@bnu.edu.cn

**Abstract:** Environmental estrogens are getting more and more attention globally owing to their serious endocrine disrupting on organisms. Because the components of solid matrices are usually complicated and estrogen contents in environment are always low, it is more difficult to determine estrogen concentration of soil, sludge and manure than that of water phase like surface water or the effluent from wastewater plant. This paper reviewed the advances of the international studies on the estrogen detection in solid medium in recent years. Various kinds of extraction methods, purification procedures and determination assays used presently were summarized and discussed, in attempt to supply the useful information for the future research in this field.

**Keywords:** Estrogens; Extraction; Purification; Detection

## 固相介质中雌激素提取与检测的研究进展

韩伟<sup>1</sup>, 杨明<sup>1</sup>, 李艳霞<sup>1</sup>, 李惟<sup>2</sup>, 廖超子<sup>3</sup>, 熊雄<sup>2</sup>, 张丰松<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北京师范大学环境学院 水环境模拟国家重点实验室 北京 100875;

<sup>2</sup>中国科学院地理科学与资源研究所 北京 100101;

<sup>3</sup>农业部农产品质量安全中心 北京 100081;

\*责任作者, Email: liyxbnu@bnu.edu.cn

**摘要:**作为典型的内分泌干扰物, 雌激素是目前环境领域关注的热点。由于污泥、土壤、底泥和畜禽粪便等介质的复杂性, 以及雌激素在环境中的低含量特点, 使得固相介质雌激素的提取检测与水样相比更加困难。本文综述了近年来国内外关于固相介质中雌激素各种提取、净化和检测方法的研究进展, 比较了各自的优缺点, 为分析环境固体中的雌激素提供借鉴。

**关键词:**雌激素; 提取; 净化; 检测

### 1 引言

雌激素(Estrogens)是一类典型的内分泌干扰物(EDCs), 包括天然和合成雌激素。天然雌激素有雌酮(E1)、17 $\beta$ -雌二醇(E2)、17 $\alpha$ -雌二醇(17 $\alpha$ -E2)和雌三醇(E3), 由人与动物分泌排泄; 人工合成的雌激素主要有炔雌醇(EE2)、炔雌醇甲醚(MES)、己烯雌酚(DES)等, 主要用做保健药物避孕丸、畜禽促生长剂等<sup>[1-3]</sup>。

污水处理厂与集约化畜禽养殖场是环境中类固醇雌激素的两大主要源头。类固醇雌激素随着污水厂的

出水、养殖场废水出水以及畜禽粪便的农用进入环境, 对受纳水体和农田土壤构成威胁, 越来越多的研究证实, EDCs 是引起水生生物和野生动物雌性化现象的罪魁祸首<sup>[4-6]</sup>。

1994 年英国首次报道了污水中雄鱼雌性化现象<sup>[2]</sup>, 此后水体(污水厂出水, 地表水等)中的雌激素得到了很大关注, 很多国家的相关组织和机构对水体中雌激素进行了大量的研究<sup>[6-12]</sup>, 因此对水体中雌激素的分析与检测方法相对较为完善。由于雌激素的辛醇-水分配系数在 3.13 和 5.07 之间<sup>[13]</sup>, 容易吸附在土壤、底泥等固相介质中<sup>[14]</sup>, 从而使得底泥、污泥和施用粪便后的土壤成为雌激素的二次污染源<sup>[15,16]</sup>。但

资助信息: 环保公益性行业科研专项经费资助(200909042), 国家自然科学基金项目(20977010)

是与水体相比而言, 固相介质(畜禽粪便、土壤、污泥和底泥)成分更为复杂, 有机物含量高, 这给固体介质中雌激素的提取与检测带来很大困难, 相关的研究报道相对较少, 而且在现有固体介质雌激素分析研究当中, 采用的提取、分离、净化以及测定方法也存在较大差异。基于此点, 本文综述了目前研究中关于固体介质中雌激素的提取、净化和检测等实验研究方法, 以期为相关研究提供一定的借鉴, 为全面了解雌激素在环境中的行为、研究其在环境的残留以及生态风险评估提供初步的方法参考。

## 2 固体基质中雌激素的提取及方法

分析水相与固体基质中雌激素的主要区别是提取方式的不同, 水中雌激素的提取方法主要有液液提取和固相萃取<sup>[17]</sup>, 通常水样的预处理手段是酸化后通过滤膜(玻璃纤维, 孔径 0.22-1.2 $\mu\text{m}$ )去除颗粒物直接液液提取或上 SPE 柱固相萃取<sup>[3]</sup>。而目前针对污泥、土壤、底泥和粪便等固相介质中雌激素的提取方法包括超声波萃取<sup>[13,18-20]</sup>、微波辅助萃取<sup>[21,22]</sup>、加速溶剂萃取<sup>[23-25]</sup>、震荡提取<sup>[26-28]</sup>和索式萃取<sup>[29]</sup>。以下是各种提取方法的特点以及各自的优缺点。

### 2.1 超声萃取(Ultrasonic Extraction, UE)

超声萃取是一种常用的萃取方法, 基于超声空化作用的原理, 使固体样品在溶剂中更易分散和乳化, 加速样品的溶解速度, 超声波的热作用也能促进超声波强化萃取<sup>[30]</sup>。在超声作用下, 存在于固相中的类固醇雌激素可溶解于有机溶剂从而被提取出来, 相比经典的索式萃取既可节约大量的试剂又可节省时间, 并且萃取回收率较高。但固相介质差异、有机溶剂的不同以及超声时间的长度会影响萃取效果。

Arditsoglou 和 Voutsas<sup>[31]</sup>利用超声方法(时间 20min)同时萃取底泥和水体悬浮颗粒中的烷基酚和类固醇雌激素, 结果发现, 甲醇与丙酮混合液作为萃取剂效果明显优于单独采用甲醇或丙酮作为萃取剂。Ternes 等<sup>[18]</sup>以甲醇和丙酮超声 10min 提取污泥和底泥中的雌激素, 样品的回收率也全部在 70%以上。Braga 等<sup>[19]</sup>利用超声方法对海洋底泥中雌激素的萃取回收率分别达到 E1: 89%, E2: 93%, EE2: 98%, 可见超声萃取的优良效果。而 Stanford 和 Weinberg<sup>[20]</sup>将土壤溶于乙腈中超声 1h 后离心, 得到四种不同类型的土壤 E1、E2 和 EE2 的回收率范围分别是 60-76%、57-85% 和 62-99%。Hájková 等<sup>[13]</sup>比较了 6 种不同萃取剂对底

泥中的 4 种天然与合成类固醇雌激素的提取效果, 结果表明, 丙酮与正己烷的混合液萃取效果最好, 经过 30min 的提取, E1、E2、EE2 和 DES 的回收率依次达到 111%、92%、96%和 97%。总体上来讲, 超声波提取土壤、底泥和污泥中类固醇雌激素均可获得较高的回收率, 同时提取效果受到基质类型、萃取时间等的影响, 选择合适的萃取剂是获得满意效果的关键。

### 2.2 加速溶剂萃取(Accelerated Solvent Extraction, ASE)

加速溶剂萃取是通过提高温度和增加压力使有机溶剂更好地进入样品基质, 有利于被萃取物与溶剂的接触并提高萃取效果。温度的提高能加速溶质分子的解析动力学过程, 减小解析过程所需的活化能, 使溶质从基质中解析并快速进入溶剂<sup>[23]</sup>。加速溶剂萃取, 具有有机溶剂用量少、萃取快速、效率高、样品回收率高等突出优点, 被美国环保局(EPA)推荐为标准方法, 是一种快速提取固相介质中有机污染物的萃取方法。

Beck 等<sup>[23]</sup>对土壤中的四种天然雌激素进行加速溶剂萃取条件优化时发现, 在不同温度条件(20 $^{\circ}\text{C}$ -100 $^{\circ}\text{C}$ )下, 使用丙酮得到的萃取回收率为 89-103%为最佳, 乙酸乙酯为 71-100%, 乙腈则为 75-93%; 但是, 甲醇、二氯甲烷等其他溶剂的萃取回收率均低于 50%, 并且温度过高过低也会影响土壤中雌激素的萃取效率, 以 60 $^{\circ}\text{C}$ 为最佳。Noppe 等<sup>[24]</sup>利用 ASE200 对河流悬浮物中雌激素进行快速萃取, 其中 17 $\alpha$ -E2, E2, E1 和 EE2 的回收率依次为 110%、127%、124%和 87%, 所使用的萃取溶剂为 1: 1 的甲醇和丙酮混合液, 温度和压强分别为 100 $^{\circ}\text{C}$ 和 2000psi。同样利用 ASE200, Nieto 等<sup>[25]</sup>同时对污泥中的游离态和结合态雌激素进行提取, 结果显示, 当选择 1: 1 的丙酮: 甲醇作萃取剂时, 温度 75 $^{\circ}\text{C}$ 、压强 1500 psi 条件下, 四种天然雌激素的回收率可达到 91-97%范围内, 效果最佳。因此加速溶剂萃取的效率与样品基质类型、有机溶剂的选择、萃取剂的体积以及具体的温度条件也具有密切关系。

### 2.3 微波辅助萃取(Microwave Assisted Extraction, MAE)

在微波能的作用下, 选择性地将样品中的目标组分以其原始的形式萃取出来的技术称之为微波辅助萃取技术, 简称微波萃取技术, 主要用于有机污染物的分析, 是一种比较重要的萃取技术<sup>[32]</sup>。微波萃取的优

点在于它能够将能量快速传递到整个溶剂中，并使溶剂得到快速加热<sup>[33]</sup>。影响微波萃取效率的参数包括萃取剂以及温度。Matějčíková<sup>[22]</sup>发现，即使在不加有机萃取剂的情况下，微波对底泥中结合态雌激素的提取效率仍能达 88.5%-100%，但对游离态雌激素的回收率仅为 10-55%。当采用水：甲醇（25：75）作为萃取剂，温度为 60℃、萃取时间为 15min 时，各类雌激素提取回收率都可达到 64-100%，并且在 25-120℃温度范围内，雌激素的萃取效率随着温度的提高而增大。Labadie 和 Hill<sup>[21]</sup>同样利用微波萃取底泥中的雌激素（实验条件：萃取时间 5min，温度为 90℃），提取回收率大于 92%，说明利用微波萃取固体介质中的雌激素时，合理的萃取剂及温度范围内可以获得较高的提取效果。

### 2.4 索式萃取 (Soxhlet Extraction, SE) 及其它萃取方法

索式提取又称脂肪提取，是一种从沉淀物和生物组织等固体样品中提取目标物的方法，适合于提取痕量物质，但索式提取较为费时、操作繁琐且易将其其他非目标有机物萃取出来<sup>[30]</sup>。Peng 等<sup>[29]</sup>研究索式提取法提取底泥中雌激素的效率发现，MES 和 E2 的回收率仅能达到 28-37%和 39-40%。因为索式提取法提取时

间较长，并可能导致某些相对不稳定的雌激素降解致使回收率偏低，因此近期的研究中很少再有采用该方法的报道。

振荡提取也是一种提取固相介质中目标污染物的方法。Raman 等<sup>[28]</sup>在分析猪粪和牛粪中的雌激素含量时，将粪样溶于萃取剂中震荡提取 2 小时，最后利用酶联免疫法检测也达到了满意的效果。Zheng 等<sup>[26]</sup>同样将奶牛粪便溶于乙醚中利用摇床震荡 1 小时，经浓缩衍生后利用 GC/MC 检测到牛粪中类固醇雌激素的总量高达 2103ng/g，方法质量控制表明四种天然雌激素的回收率为 87.5-96%。利用相同的提取方式，Arnon 等<sup>[27]</sup>以乙酸乙酯提取底泥中的 E2 回收率大于 90%。可见尽管震荡提取需用时间相对较长(1h, 2h 和 24h)，但提取方式简单，操作要求不高。

### 3 分析目标物的净化及方法

由于污泥、畜禽粪便、底泥、土壤等固相介质中有机杂质含量高，萃取后提取液中仍含有大量的干扰物，在进样检测分析前必须对样品进行净化。常用的净化方法有固相萃取柱富集浓缩、硅胶净化、硅酸镁净化、GPC 净化以及 HPLC 净化等（表 1）。

表 1 固相介质中类固醇雌激素的提取与分析方法

Table 1 Analysis methods of steroid estrogens in solid matrices

样品基质	雌激素名称	萃取方法 (提取剂)	净化步骤	衍生试剂	检测手段	回收率与检测限	参考文献
猪粪	E1,E2	ASE (丙酮:甲醇,1:1)	SPE+ silica gel	衍生	GC/MS/MS	86-95%	[16]
牛粪	E1,E2,17α-E2,E3	振荡 (乙醚)	—	七氟丁酸酐	GC/MS	80-111%;2ng/g	[26]
猪、牛粪	E2	振荡 (乙醚)	—	无	ELISA	>100%	[28]
污泥	E1,E2,EE2, MES	超声 (甲醇,丙酮)	GPC+ silica gel	MSTFA	GC/MS/MS	83%-121%; 2ng/g	[18]
污泥	E1,E2	震荡 (正己烷,丙酮)	GPC+C18 SPE	BSTFA/TMS	GC/MS	83.1%-105.7%	[10]
污泥	E1,E2,E3,EE2	机械振荡 (乙酸乙酯)	SPE (硅胶柱)+GPC+SPE(离子交换柱)	无	LC/MS/MS	>84% 2.1-5.3ng/g	[43]
污泥	E1,E2, 17α-E2,EE2,E3	ASE(甲醇: 丙酮 1: 1)	—	—	LC/MS/MS	82-97% 11-150ng/g	[25]
土壤	E1,E2,17α-E2, E3	加速溶剂提取 (丙酮)	C18 SPE	MSTFA	GC/MS	79-103% 1ng/kg	[23]
河流底泥	E1,E2,EE2, MES	超声 (甲醇,丙酮)	Silica gel+C18SPE+HPLC	MSTFA	GC/MS/MS	98%-118% 0.2ng/g	[18]
河流底泥	E1,E2,17α-E2,EE2, MES	超声 (甲醇: 丙酮,1: 1)	Florisil gel	BSTFA	GC/MS	>60% 5.3-10.4ng/g	[31]
河流底泥	E1,E2,EE2,E3,DES	超声 (甲醇:丙酮,1:1)	GPC+ Silica gel	BSTFA/TCMS/TMSI	GC/MS	68.8-109.6% 0.06-0.10 ng/g	[44]
河流底泥	E1,E2,EE2	MAE(甲醇)	SPE柱 (HLB)	BSTFA	GC/MS	86-102% 0.05-0.14ng/g	[45]
河流底泥	E1,E2, 17α-E2,EE2,E3,DES	超声(甲醇:乙酸乙酯,3:7)	—	五氟丙酸酐	GC/MS	86.7-111.2% 0.05-1.27 ng/g	[36]
池塘底泥	EE2	超声(丙酮,甲醇)	Alumina Column	BSTFA	GC/MS	68-99% 0.8 ng/g	[46]
河流底泥	E1,E2,17α-E2,E3,EE2	微波辅助萃取(甲醇溶液)	OasisWAX 柱-SPE	无	HPLC/MS/MS	83-107% 1ng/g	[22]

河流底泥	E1,E2,E3,EE2,DES	超声萃取 (正己烷,丙酮)	QasisHLB-SPE 净化	无	GC/MS	75%-133% 1.5-5ng/g	[13]
河流底泥	E1,E2,E3,EE2	震荡 (正己烷,丙酮)	GPC+C18-SPE 净化	无	LC/MS	52.4%-78.6%	[10]
河流悬浮物	E1,E2,EE2	ASE (丙酮,甲醇)	HPLC 净化	MSTFA	GC/MS/MS	87%-127% 0.84 ng/g	[24]
海洋底泥	E1,E2,EE2	超声萃取 (丙酮,正己烷)	C18-SPE 净化	衍生	GC/MS	89.1%-98.6%	[19]
海洋底泥	E1,E2,EE2,E3	超声 (乙腈水溶液)	SPE+GPC+Florisil gel	无	LC/MS/MS	69%-119% 0.03-0.3ng/g	[47]
海洋底泥	E2,17 $\alpha$ -E2, EE2	超声 (乙酸乙酯)	Alumina Column	无	LC/MS/MS	89-92% 0.20-0.28ng/g	[48]
海洋底泥	E1,E2,EE2,DES	ASE(二氯甲烷)	GPC柱+层析硅胶 (Layer silica)	MSTFA	GC/MS	84-99% 0.08-1.27ng/g	[49]

注: “—”表示相关数据不可得

固相萃取技术 (SPE) 是一种基于液固分离的试样预处理技术, 一般用作水体中目标物的萃取, 但在固相介质 (土壤、污泥和底泥等) 的预处理中, 常利用该技术的富集分离功能来做净化。SPE 具有较高的回收率和富集倍数、操作简单快速易于实现自动化、使用有机溶剂量少、无相分离操作易于收集分析物组分以及能处理小体积试样等优点<sup>[32]</sup>。SPE 的净化效果与 SPE 柱的填料类型以及活化剂、洗脱试剂的选择有关。Matejicek 等<sup>[22]</sup>进行底泥中雌激素的净化试验中验证了三种 SPE 柱的净化效果, 其中 Oasis HLB 和 Oasis WAX 柱的净化效果 (回收率 88%-97%) 明显高于 Oasis MAX 柱。同样在对底泥中雌激素的测定方法研究中, Hajkova 等<sup>[13]</sup>也证实 Oasis HLB 柱的净化效果比 Supelclean LC-18 柱和 ENVI-Carb 柱效果好, 前者净化后回收率为 67-113%, 而后两者的回收率很低, 甚至于全部损失而检测不出。当用同样的 Oasis HLB 柱, 采用不同的溶剂时, 净化效果也有差别, 其中 5 mL 乙腈: 水 (10: 90, v/v) 为活化剂, 以乙腈: 1% NH<sub>4</sub>OH 混合液 (95: 5, v/v) 为洗脱剂, 净化回收率达到 96%-116%, 明显优于其他活化剂和洗脱剂的净化效果。

Arditsoglou 和 Voutsas<sup>[31]</sup>在比较不同 SPE 柱 (Oasis HLB, C18, 硅酸镁, 硅胶, 氧化铝硅胶柱) 净化底泥的效果后发现, 硅酸镁柱净化后 E<sub>2</sub>、E<sub>1</sub> 和 EE<sub>2</sub> 的回收率都大于 80%, 效果最佳。Ternes 等<sup>[18]</sup>将底泥经过硅胶净化、RP-C18SPE 柱净化和 HPLC 分离三个净化步骤, 最后利用 GC/MS/MS 检测到底泥中的雌激素回收率均大于 90%, 而将污泥经过硅胶和 GPC 净化去除其中的有机杂质后, E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 的回收率为 66%-104%。但是 Hájková 等<sup>[13]</sup>仅利用 GPC 净化底泥中的杂质时, 因不能去除其中的雌激素共萃取物而最终无法检测。由此看来, SPE 是分析固相介质中雌激素过程中最常用的一种净化手段, 但是对于比较复杂

的介质比如污泥和畜禽粪便等, 除 SPE 净化外, 还需要加入硅胶净化、GPC 或 HPLC 净化等步骤。

## 4 检测手段

雌激素的检测手段方法包括仪器检测和生物分析。仪器分析法首先实现多种雌激素的分离, 然后用特定的检测器进行定性定量测定, 常用的分析仪器有气质联用与液质联用。质谱分析法是通过样品离子的质量和强度的测定进行成分、结构分析, 鉴别能力强, 灵敏度高, 响应速度快。为了提高环境样品雌激素的检出效率, 质谱或串联质谱被广泛采用。生物法检测主要有酶联免疫法、放射性免疫以及酵母菌重组分离法等。

### 4.1 气相色谱-质谱联用 (GC/MS, GC/MS/MS)

气相色谱法具有高效、灵敏、快速、能同时分离多种组分、样品用量少、应用广泛的特点, GC/MS 联用技术增强了对复杂化合物的分辨力, 高分辨毛细管柱气相色谱-高分辨质谱联用技术即发挥了毛细管气相色谱的高分辨率又发挥了质谱法的高鉴别力, 是检测雌激素最有效的工具之一<sup>[34]</sup>。

Peng 等<sup>[29]</sup>利用 GC/MS 检测底泥中的多种雌激素时, E<sub>1</sub>、17 $\alpha$ -E<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、MES 的检测限分别达到 0.6、0.6、0.8、1.5 和 2.5ng/g。Zheng 等<sup>[26]</sup>利用 GC/MS 检测奶牛粪便中的四种天然雌激素, 检测限为 2ng/g。同样利用 GC/MS, Arditsoglou 和 Dimitra<sup>[31]</sup>检测底泥中的类固醇雌激素, 方法检测限达为 4.5-10.4ng/g, 定量检测限则为 14.4-33ng/g。当 Noppe 等<sup>[24]</sup>利用质谱串联检测器分析河口悬浮固体中的雌激素时, 检测限达到 0.2-1 ng/g。

采用 GC/MS 联用技术分析雌激素时需要衍生化, 因为类固醇雌激素基本都含有羟基官能团, 极性相对较大, 直接利用 GC/MS 检测容易在色谱柱内产生吸

附,从而使检出值低于实际值,灵敏度下降,所以需要通过衍生化将类固醇雌激素转化成挥发性好且热稳定的衍生物。目前对于 E1、E2、E3、EE2 上的羟基官能团采用的衍生化方式主要有硅烷化和乙酰化,经衍生后生成极性较小、容易挥发和更适合气相色谱分离的化合物<sup>[34]</sup>。

从表 1 中可以看出,常用的硅烷化衍生剂有: N-甲基-N-三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA)、N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺 (BSTFA)、N,O-双三甲基硅烷乙酰胺 (TMSA) 以及 N-甲基-N-叔丁基二甲基硅基三氟乙酰胺 (MTBSTFA)。MTBSTFA 只对 E1、E2 有很好的衍生效果,不能衍生 E3,却可以将 EE2 衍生成 E1 的衍生产物。Shareef 等<sup>[35]</sup>也指出 BSTFA 和 MTBSTFA 并不适合做 EE2 和 E1 的衍生试剂,因 EE2 的衍生物部分转化为 E1 的衍生物,从而影响 E1 和 EE2 含量的准确性。但 Zhang 等<sup>[36]</sup>指出,衍生过程中加入嘧啶可以抑制此现象发生从而优化衍生效果。常用的乙酰化试剂主要有:五氟丙酸酐 (PFPA) 和七氟丁酸酐 (HFB)<sup>[26,29,37]</sup>。Peng 等<sup>[29]</sup>在对底泥中的雌激素衍生时发现 PFPA 衍生效果优于 BSTFA。

衍生一般在高温下进行,衍生时间大约为 30min 至 2h,温度范围 60°C-80°C。有研究表明,温度对不同衍生剂的影响存在差异。Zheng 等<sup>[26]</sup>比较 55°C 和 80°C 条件下 HFB 的衍生效果发现,55°C 时衍生结果变化率为 23%-52%,而在 80°C 时变化率仅为 4%-12%。由此看来对于不同衍生剂,衍生化时温度的控制也是影响测定结果的一个重要方面。

#### 4.2 液相色谱-质谱联用 (LC/MS, LC/MS/MS)

液相色谱-质谱联用技术具有优良的灵敏性和选择性,具有检测限低、简化样品检测前净化过程优点,特别是三级串联四级杆质谱技术的发展,极大地提高了检测灵敏度和分析结果的确定性<sup>[34,38]</sup>,目前,LC/MS 以及 LC/MS/MS 成为检测雌激素的主流。LC/MS 可以检测到痕量浓度级别的雌激素,精确性及灵敏度较高,能同时分离检测多种雌激素。Labadie 和 Hill<sup>[21]</sup>比较了 LC-TOF/MS 和 LC/MS/MS 对河流底泥中的 E1、E2 和 EE2 的检测效果,在同样提取净化条件下,MS/MS 对三种雌激素的检测限达到 15, 30, 40pg/g,而 TOF-MS 的检测限高出 13 倍,由此可以看出质谱串联的优越之处,而且与 GC/MS 和 GC/MS/MS 相比,预处理后的样品不必衍生即可上机,可以节省分析时间并且减少由衍生处理带来的损失。由表 1 可以看出其

样品的检出限通常低于 GC/MS 和 GC/MS/MS 的检出限。但液相质谱联用的缺点是测定环境样品中雌激素操作要求高、分析成本昂贵。

#### 4.3 生物检测法及与仪器分析法的比较

常用的雌激素生物检测方法有放射性免疫法 (RIA)、酶联免疫吸附法 (ELISA)、人乳腺癌 MCF-7 细胞培养法和重组酵母系统鉴别法等。以酶联免疫法为例,虽然是一个分析雌激素较为灵敏方便的方法,但因为共萃取物的交叉污染而缺乏选择性<sup>[26]</sup>。Raman 等<sup>[28]</sup>利用 ELISA 和 GC/MS 同时测定畜禽粪便中的雌激素,发现虽然分析 E2 时 ELISA 有更低的检测限,但 GC/MS 更适宜 E1 和 17 $\alpha$ -E2 的检测。在检测时间上,LC/MS/MS 分析一个样本的时间 (16min) 明显少于 ELISA 的分析时间 (45min),而且能够分析辨认中间产物结构信息<sup>[39]</sup>。另外,由于缺少色谱分离净化过程,免疫检测受到许多因素的干扰,基体中的天然有机质会造成干扰致使检测值偏高,而定量准确的 LC/MS 与 GC/MS 则更具检测的可信性<sup>[40,41]</sup>。总体看来,生物检测法更多用来描述样品中总的雌激素活性,而仪器分析法则用来定性、定量样品中各种雌激素的含量水平<sup>[42]</sup>。因此,尽管色谱-质谱联用技术操作复杂,但因其较好的分离效果、较低的检测限、同时检测、产物辨认方面的优势已经成为雌激素检测的主流手段。

### 5 结论

类固醇雌激素在环境介质中的含量很低,但由于纳克级含量的雌激素就足以引起水生生物的雌性化现象,因此潜伏着巨大的内分泌干扰危害。目前国内对雌激素研究还相对较少,尤其是对畜禽粪便、污泥等固体介质中的雌激素研究几乎为空白。为充分掌握环境样品雌激素的含量及其环境行为特征,必须建立具有高灵敏度和选择性的分析检测方法。由于基体介质的复杂性,国内外对固体介质中雌激素的研究和分析测定方法还处于广泛研究阶段。因此,针对不同的环境介质建立科学、完善的分析测定方法,对充分研究和掌握此类污染物的环境行为机理、进行有效的治理和控制具有非常重要的意义。

### References (参考文献)

- [1] Kolok A S and Sellin M K. The Environmental Impact of Growth-Promoting Compounds Employed by the United States Beef Cattle Industry: History, Current Knowledge, and Future Directions[J]. Review of Environmental Contamination and

- Toxicology, 2008, 195: 1-30.
- [2] Wang S, Huang W, Fang G Z. Analysis of steroidal estrogen residues in food and environmental samples[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2008, 88(1): 1-25.
  - [3] Kuster M, Alda M J L, Barceló D. Estrogens and Progestogens in Wastewater, Sludge, Sediments, and Soil[J]. *The Handbook of Environmental Chemistry*, 2005, 5: 1-24.
  - [4] Orlando E F, Kolok A S, Binzcik G A, Gates J L, Horton M K, Lambright C S, Jr E G, Soto A M, Jr L J G.. Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(3): 353-358.
  - [5] Katsu Y, Lange A, Ushitani H. Functional associations between two estrogen receptors, environmental estrogens, and sexual disruption in the roach (*Rutilus rutilus*) [J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(9): 3368-3374.
  - [6] Vajda A M, Barber L B, Gray J L, Lopez E M, Woodling J D, Norris D O. Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(9): 3407-3414.
  - [7] Soto A M, Calabro J M, Prechtl N V, Yau A Y, Orlando E F, Daxenberger A, Kolok A S, Guillette L S, Bizac B L, Lange I G, Sonnenschein. Androgenic and Estrogenic Activity in Water Bodies Receiving Cattle Feedlot Effluent in Eastern Nebraska, USA[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112: 346-352.
  - [8] Ternes T A, Stumpf A, Mueller J. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-I. Investigations in Germany[J], Canada and Brazil *Science of the Total Environment*, 1999, 225: 81-90.
  - [9] Johnson A C, Belfroid A, Dicorcio A. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent[J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 256: 163-173.
  - [10] Gomes R L, Birkett, J W, Scrimshaw M D. Simultaneous determination of natural and synthetic steroids and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, 85:1-14.
  - [11] Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M. 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: 195-202.
  - [12] Komori K, Tanaka H, Okayasu Y. Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan[J]. *Water Science and Technology*. 2004, 50: 93-100.
  - [13] Hájková K, Pulkrabová J, Schürek J, Hajšlová J, Poustka J, Nápravníková M, Kocourek V. Novel approaches to the analysis of steroid estrogens in river sediments[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 387: 1351-1363.
  - [14] Ying G G, Kookana R S, Ru Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment[J]. *Environment International*, 2002, 28: 545-551.
  - [15] Lorenzen A, Hendel J G, Conn K L, Bittman S, Kwabiah A B, Lazarovitz G, Masse D, Mcallister T A. Survey of hormone activities in municipal biosolids and animal manures[J]. *Environmental toxicology*, 2004, 19: 216-225.
  - [16] Kjaer J, Olsen P, Abach K, Barlebo H C, Ingerslev F, Hansen M, Sorensen B H. Leaching of estrogenic hormones from manure-treated structured soils[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(11): 3911-3917.
  - [17] Pacakova V, Loukotkova L, Bosakova Z. Analysis for estrogens as environmental pollutants-A review [J]. *Journal of Separation Science*, 2009, 32: 867-882.
  - [18] Ternes T A, Andersen H, Gilberg D, Bonerz M. Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(14): 3498-3504.
  - [19] Braga O, Smythe G A, Schafer A I, Feitz A J. Steroid estrogens in ocean sediments [J]. *Chemosphere*, 2005, 61:827-833.
  - [20] Stanford B D, Weinberg H S. Isotope dilution for quantification of steroid estrogens and nonylphenols by gas chromatography with tandem mass spectrometry in septic, soil, and groundwater matrices[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1176: 26-36.
  - [21] Labadie P, Hill E M. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1141: 174-181.
  - [22] Matejicek D, Houserova P, Kuban V. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1171: 80-89.
  - [23] Beck J, Totsche K U, Knabner I K. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Chemosphere*, 2008, 71: 954-960.
  - [24] Noppe H, Verslycke T, Wulf E D, Verheyden K, Monteyne, Caeter P V, Janssen C R, Debrabander H F. Occurrence of estrogens in the Scheldt estuary: A 2-year survey[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007, 66:1-8.
  - [25] Nieto A, Borrull F, Pocurull E, Marce R M. Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates on sewage sludge by pressured liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1213: 224-230.
  - [26] Zheng W, Yates S R, Bradford S A. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(2): 530-535.
  - [27] Arnon S, Dahan O, Elhanany S, Cohen K, Pankratov I, Gross A, Ronen Z, Baram S, Shore L S. Transport of testosterone and estrogen from dairy-farm waste lagoons to groundwater[J]. *Environmental Science and Technology*. 2008, 42: 5521-5526.
  - [28] Raman D R, Williams E L, Layton A C, Burns R T, Easter J P, Daugherty A S, Mullen M D, Saylor G S. Estrogen content of dairy and swine wastes[J]. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38(13): 3567-3573.
  - [29] Peng X, Wang Z, Yang C, Chen F, Mai B. Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1116: 51-56.
  - [30] Yu G, Niu J F, Huang J. Persistent organic pollutants-emerging global environmental problems. Beijing, Science Press. 2005, 20-25.  
余刚,牛军峰,黄俊.持久性有机污染物[M].北京:科学出版社,2005,20-25.
  - [31] Arditoglou A and Voutsas D. Determination of Phenolic and Steroid Endocrine Disrupting Compounds in Environmental Matrices [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2008, 15(3): 228-236.
  - [32] Jiang G B. Pretreatment technology of environmental samples. Beijing, Science Press. 2003, 230-231.  
江桂斌.环境样品前处理技术[M].北京:化学工业出版社,2003.230-231.
  - [33] Liu C J. The Application and research development of microwave assisted extraction [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2008, 35(3): 53-55. (Ch)  
刘春娟.微波萃取技术应用及其研究进展[J].广东化工, 2008, 35(179):53-56.
  - [34] Deng N S, Wu F. Endocrine disrupting chemicals in environment. Beijing, Chemical Industry Press. 2004, 178-204.  
邓南圣,吴峰.环境中的内分泌干扰物[M].北京:化学工业出版社,2004, 178-204
  - [35] Shareef A, Parnis C J, Angove M J, Wells J D, Johnson B B. suitability of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and N-(tert-butylidimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17beta-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spec-

- trometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1026: 295-300.
- [36] Zhang Z L, Hibberd A, Zhou J L. Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 577: 52-61.
- [37] Zhang H, Mao J, Sun C J, Wu D S, Mao L S. Determination of environmental estrogens in urine and bed mud by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Chinese journal of chromatography*, 2003, 21(5): 451-455 (Ch).  
张宏,毛炯,孙成均,吴德生,毛丽莎.气相色谱-质谱法测定尿及河底泥中的环境雌激素[J].*色谱*,2003,21(5): 451-455.
- [38] Ziegler T E and Wittwer D J. Fecal steroid research in the field and laboratory: improved methods for storage, transport, processing, and analysis[J]. *American Journal of Primatology*, 2005, 67: 159-174.
- [39] Farre M, Kuster M, Brix R, Rubio F, Alda M J L, Barcilo D. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography- quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1160: 166-175.
- [40] Hanselman T A, Graetz D A, Wilkie A C. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review[J]. *Environmental Science and Technology*, 2003, 37(24): 5471-5478.
- [41] Lee L S, Carmosini N, Sasman S A, Dion H M, Sepuleveda M S. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soils and water quality[J]. *Advance in agronomy*, 2007, 93: 2-67.
- [42] Furuichi T, Kanan K, Suzuki K, Tanaka S, Giesy J P, Masunaga S. Occurrence of estrogenic compounds in and removal by a swine Farm Waste treatment plant[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, 40(24): 7896-7902.
- [43] Chiu T Y, Koh Y K K, Paterakis N, Boobis A R, Cartmell E, Richards K H, Lester J N, Scrimshaw M D. The significance of sample mass in the analysis of steroid estrogen in sewage sludge and the derivation of partition coefficients in wastewaters[J]. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216: 4923-4926.
- [44] Lei B L, Huang S B, Wang D H, Luo J P, Wang Z J, Liu C I. Present state of six estrogens in the sediment of wenyuhe river[J]. *Environmental science*, 2008, 29(9): 2419-2425 (Ch).  
雷炳莉,黄圣彪,王东红,骆坚平,王子健,刘操. 温榆河沉积物中6种雌激素的存在状况[J].*环境科学*, 2008, 29(9): 2419-2424.
- [45] Hibberd A, Maskaoui, K, Zhang Z, Zhou J L. An improved method for the simultaneous analysis of phenolic and steroidal estrogens in water and sediment[J]. *Talanta*, 2009, 77: 1315-1321.
- [46] Dai G B, Yang C, Dang Z. Determination of synthetic hormone in sediment by gas chromatography - mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*. 2008, 27(1): 63-65 (Ch).  
戴国斌,杨琛,党志.池塘底泥中合成激素的气相色谱-质谱测定[J].*分析测试学报*, 2008,27(1):63-65.
- [47] Isobe T, Serizawa S, Horiguchi T, Shibata Y, Managaki S, Takada H, Morita M, Shiraishi H. Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144: 632-638.
- [48] Robinson B J, Hui J P M, Soo E C. Estrogenic compounds in seawater and sediment from Halifax Harbour, Nova Scotia, Canada[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(1): 18-25.
- [49] Zhang X, Li Q, Li G, Wang Z, Yan C. Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay Sediment, China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, 58, 1210-1216.