

典型内分泌干扰物的检测技术

关小红^{1,2}, 张 静¹, 梁丽萍¹, 仇保华³, 杜鹃山¹

(1. 哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨; 2. 同济大学 环境科学与工程学院, 200092 上海; 3. 威海市环境宣教信息中心, 264200 山东 威海)

摘 要: 内分泌干扰物的检测对保障环境中人和动物的安全非常必要. 概述了环境中痕量内分泌干扰物的检测进展, 主要的检测技术包括生物法和质谱法. 生物法是判定化合物是否为内分泌干扰物及其雌激素活性大小的非常有前景的方法, 该方法主要分为整体器官法、细胞法和非细胞法 3 类. 在内分泌干扰物定量分析方面, 质谱法的灵敏度和准确度都很高, 但样品预处理过程对整个测试结果的准确性影响很大, 为此, 又开发出了多种高效、快速的新型萃取技术. 最新的检测技术将生物法和质谱法串联结合, 达到同时测定雌激素活性和化合物浓度及其结构的目的. 内分泌干扰物后期的研究主要可以从以下几方面开展: 内分泌干扰物源头的减少、敏感群体最大暴露剂量的确定、污染区域的修复和大区域环境中内分泌干扰物的迁移转化机制等.

关键词: 内分泌干扰物; 检测; 生物基础实验法; 质谱法; 萃取

中图分类号: X171.5

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2012)12-0032-09

Analytical methods for typical endocrine disrupting chemicals

GUAN Xiao-hong^{1,2}, ZHANG Jing¹, LIANG Li-ping¹, QIU Bao-hua³, DU Juan-shan¹

(1. State Key Lab of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;
2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, 200092 Shanghai, China;
3. Environmental Propaganda and Educational Information Center in Weihai, 264200 Weihai, Shandong, China)

Abstract: This paper described the developments in the methods of EDCs detection. Biologically based assays, which comprise whole organism assays, cellular bioassays and non-cellular assays, seem to be promising methods for the determination of endocrine activities. On the other hand, the mass-based analytical methods show excellent sensitivity and precision for EDCs' quantification. Several extraction techniques for the instrumental analysis have been developed since they are crucial in determining the overall analytical performances. To achieve both quantitatively and qualitatively successful analysis for EDCs, a combined approach incorporating two types of analyses was proposed, known as a bioassay-directed chemical analysis (BDCA) method. Further studies on EDCs need to be conducted, such as source reduction, limiting exposure to vulnerable populations, remediation of contaminated sites, and the detailed understanding of transport mechanisms in the environment.

Key words: endocrine disrupting chemicals (EDCs); determination; biologically based assays; mass-based analytical methods; extraction

内分泌干扰物 (endocrine disrupting chemicals, 即 EDCs) 也称环境激素 (environmental hor-

mones), 是一种外源性干扰内分泌系统的化学物质, 指环境中存在的能干扰人类或动物内分泌系统诸环节并导致异常效应的物质. 它们通过摄入、积累等各种非直接途径给生物体带来异常影响, 即使极低的浓度也可能引起生殖障碍、行为异常、生殖能力下降、幼体死亡、甚至灭绝. 内分泌干扰物种类繁多、毒性持久、危害潜伏期长, 直接威

收稿日期: 2012-04-12.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (21077029).

作者简介: 关小红 (1977—), 女, 教授, 博士生导师.

通信作者: 关小红, guanhx@tongji.edu.cn.

胁人类和其他生物的健康,已引起重视^[1-4]. 环境中内分泌干扰物的水平与人类及其他生物健康之间存在非常复杂的相关性,如常见的人工合成的非甾类的雌激素——己烯雌酚可以引起男性精子数量的减少^[5-6]. 近年,美国和欧洲的研究数据显示男性精子密度有下降的趋势^[7];荷兰的研究也表明血清中多氯联苯(PCB)的浓度与精子数量呈负相关性^[8]. 人体很多部位均可以使雌激素受体表达,如大脑、免疫系统、心血管系统、肺部、乳腺、肝脏、肾脏、生殖系统(卵巢、子宫和睾丸)、脂肪组织和骨骼等^[9]. 小白鼠组织实验证明内分泌干扰物可

以富集到后代白鼠体内^[10-11].
随着分析仪器的发展和分析技术的进步,越来越多的人工合成化合物被确定为可能的内分泌干扰物. 表 1 介绍了一些已经被证明具有雌激素活性的物质^[3,12],主要包括烷基酚-乙氧基非离子型表面活性剂和其降解产物、食品添加剂、香味剂、抗氧化剂、阻燃剂、增塑剂、工业溶剂、消毒剂、粪固醇、多环芳烃和经常使用的杀虫剂、除草剂等. 这些物质中大部分并没有受到法律法规的限制,但随着环境标准越来越严格,很可能被列入内分泌干扰物的名单中^[13].

表 1 环境中可能的内分泌干扰物分类^[3,12]

分类		名称
药物	抗生素	三甲氧苄二氨嘧啶,红霉素
	止痛药和消炎药	可待因,布洛芬,醋氨酚,阿斯匹林,双氯芬酸,非诺洛芬
	抗精神病药	地西泮
	脂质调节剂	苯扎贝特,氯贝酸,非诺贝酸
	β-受体阻滞药	美托洛尔,普萘洛尔,噻吗洛尔,倍他索洛尔,甲磺胺心定,阿替洛尔,美托洛尔
	拟交感神经药	特布他林,沙丁胺醇
	X 射线造影剂	碘普胺,碘帕醇,二乙酰氨基三碘苯甲酸盐
	雌激素类	17β-雌二醇,17α-乙炔基雌二醇,雌素酮,雌激素三醇,己烯雌酚,双酚 A,睾酮,4-壬基酚
农药类	杀虫杀螨剂	DDT 及其代谢产物,林丹,菊酯类(氰戊菊酯,苯醚菊酯和和氯菊酯),有机磷,氨基甲酸酯类杀虫剂,对硫磷,马拉硫磷,涕灭威,西维因,毒死蜱,乐果,敌百虫,敌敌畏,克百威,双虫脒,甲萘威,七氯,环氧七氯,灭多威,灭蚁灵,反式九氯,氧化氯丹
	杀菌剂	乙烯菌核利,腐霉利,代森类杀菌剂,多菌灵,十三吗啉,乙撑硫脲,氯苯嘧啶醇,腈苯唑,异菌脲,代森锰锌,代森锰,代森联,腐霉利,啞霉胺,福美双,三唑酮,三唑醇,代森锌,福美锌
	除草剂	阿特拉津,氟乐灵,氟草津,利谷隆,乙草胺,甲草胺,杀草强,莠去津,嗪草酮,除草醚,二甲戊乐灵,七氯氮苯,氨基丙腐灵
个人护理品	香味剂	硝基香味剂,多环香味剂,大环香味剂
	防晒剂	苯甲酮,甲基苄亚基樟脑
	驱虫剂	N,N-二乙基-3-甲基苯甲酰胺
	防腐剂	三氯生,氯苯
	阻燃剂	多溴代二苯醚,三(2-氯乙基)磷酸盐,四溴双酚 A
化工原料	表面活性剂	烷基酚乙氧基化物,烷基酚,烷基酚羧酸盐,五氟辛烷磺酸盐
	工业添加剂	EDTA,苯磺酸盐
	汽油添加剂	烷基醚,甲基叔丁基醚
	增塑剂	邻苯二甲酸二甲酯,邻苯二甲酸二乙酯,邻苯二甲酸二丁酯
其他	消毒副产物	三碘代乙烷,次溴酸盐,溴代乙腈,溴代乙醛,氰基甲醛,溴酸盐,亚硝基二甲胺
	藻毒素和贝类毒素	贝类毒素,类毒素-A,微囊藻毒素,节球藻毒素

1 内分泌干扰物的雌激素活性检测

生物学基础实验是判断化合物是否为内分泌干扰物和确定内分泌干扰物雌激素活性强弱的有效方法,其原理是假设目标化合物已经被确定为

内分泌干扰物,并且化学性质已知,通过雌激素活性生物实验对单一内分泌干扰物定量. 通过生物学基础实验确定内分泌干扰物雌激素活性的方法主要分为以下几类:细胞增殖、荧光素酶检测法、卵黄蛋白原检测法和雌激素受体竞争筛选法. 细

胞增殖主要通过细胞生长和分裂来检测雌激素活性^[14]。荧光素酶检测法是在细胞溶解之后投加荧光素,当其与相对应的抗原或抗体起反应时,形成的复合物上就带有一定量的荧光素,在荧光显微镜下可以看见发出荧光的抗原抗体结合部位,检测出抗原或抗体^[15]。卵黄蛋白原 (Vitellogenin, VTG) 存在于卵生动物血液中,是一种高分子质量的脂磷聚糖蛋白 (Lipophosphoglycoprotein), 为卵黄蛋白的前体。卵黄蛋白原是雌鱼的特异性蛋白,在卵黄形成期雌激素的刺激下,由肝脏产生,通过血液循环进入卵巢,降解形成卵黄蛋白,储藏于卵黄中,为胚胎的生长发育提供氨基酸、碳水化合物、维生素、磷和硫等营养和功能性物质。雄性和幼年动物在大剂量的人工雌激素和低剂量的类雌激素长期作用下也能生成卵黄蛋白原。因此,卵黄蛋白原可作为生物标志物,通过检测雄性及幼年动物血液中是否存在卵黄蛋白原来评价生物体是否受到内分泌干扰物的影响^[16]。雌激素受体竞争筛选法的检测原理是用待测化合物替换受体结合探针分子的能力来评价化合物的激素效应水平。目前使用的探针以放射标记为主,也应用荧光标记的高亲和力配体。该试验需制备含激素受体丰富的胞液提取物或重组的激素受体源,如细菌、酵母等^[17]。

生物学基础实验根据受试对象的不同主要分为整体器官法、细胞单体法和非细胞法。

1.1 整体器官法

整体器官测试法利用两栖动物、鱼类、鸟类和虫类等体内的内分泌系统变化来监测水环境中内分泌干扰物含量的变化。环境中野生豹蛙 (*Ranapipeus*) 性腺变异的数量可以很好地指示环境内分泌干扰物的浓度变化^[18]。利用鱼类对内分泌干扰物进行监测的研究也不少,例如北美虹鳟鱼、黑头呆鱼、羊头原鲷和斑马鱼等幼鱼的内分泌系统影响其性腺和显型的发育^[2,15,19-22]。一些基因工程的鱼类也可以作为内分泌干扰物的指示,如转基因驯化的斑马鱼可以使荧光酶表达并且产生卵黄蛋白原^[15],青鳞鱼和布里斯托金鱼均可以在卵黄蛋白原的作用下产生绿色的荧光蛋白^[23]。

整体器官测试法选用对内分泌干扰物极为敏感的代表性生物作为指示生物,定量分析内分泌干扰物对目标物种的实际影响。此外,将生物暴露于一定含量的内分泌干扰物中可以测定内分泌干扰物在生物体内的累积效应。本方法最大的缺陷是特定生物种群只能对特定种类的内分泌干扰物产生响应。尽管生物指示种群可以对内分泌干扰

物产生响应,但引起响应的源仍模糊不清,需要深入研究。

1.2 细胞法

细胞实验法主要基于雌激素和雌激素受体结合产生的二聚物蛋白的表达。荧光蛋白和牛乳糖即是这种响应蛋白的例子。细胞溶解之后,荧光蛋白可以用荧光光度计进行定量,牛乳糖则可以用分光光度计进行定量,在酶催化反应结束后,依据染色强度推算雌激素活性的大小^[24]。细胞法适用于测定非特定连接于单一目标分子的雌激素活性。通过观察不同物种甚至人类组织的细胞行为来判定雌激素活性的强弱远比观察这些物种的雌激素反应更容易,同时,了解动物细胞对内分泌干扰物响应的本质有助于明确内分泌干扰物对人体的影响。

细胞单体生物实验法的灵敏度基本可以和质谱法相抗衡,且响应快、不需要质谱分析中的质谱检测器或者串联质谱检测器等其他附属设备。然而当环境中有多种内分泌干扰物同时存在时,由于不同内分泌干扰物间的拮抗作用或者协同作用,细胞生物实验法不能提供准确的定量分析,该方法适用于单一内分泌干扰物的检测分析。

1.3 非细胞法

上一节介绍的细胞生物实验法必须使用完整的细胞体,因此,会受到细胞膜通透性、细胞功能、器官所处的生命阶段和给定样品的雌激素活性响应灵敏度的影响。非细胞实验法能够避免这些问题,并且对内分泌干扰物的检测限更合理。酶连接的免疫吸收剂分析 (ELISA) 和酶连接的受体分析 (ELRA) 可以对内分泌干扰物进行定量,但所需要的实验室操作系统复杂^[25]。目前,商用酶连接的免疫吸收剂试剂盒可以对多种已知的和可能的内分泌干扰物进行分析^[17]。

非细胞法将来可能会应用于检测内分泌干扰物的便携式生物传感器中。Endotect 系统和 RIver ANALyser (RIANA) 系统即是两种成功的商用便携式生物传感器。Endotect 生物传感器的原理是将人体雌激素受体 (hER) 连接于荧光细胞上,采用瞬间捕获型检测器捕获内分泌干扰物与受体耦合过程中会产生的荧光^[26]。RIANA 系统使用抗体替代雌激素受体,抗体上化学专一性的区间含有产生荧光的结构,当内分泌干扰物作为抗原与其结合时即可发射荧光^[27]。为了检测 3 种目标物 (阿特拉津、异丙隆和雌激素酮) 的含量,RIANA 系统利用多元分析物免疫感受器测定内部反射的总荧光强度,结果表明在多种水源水体中,

3 种目标分析物的含量变化不大, 均在可接受的浓度范围内^[27].

近年, 荧光指示剂、电化学传感器和微阵列相对耦合分析等技术也取得了进步. 荧光指示剂中的单细胞共活化剂 (SCCoR) 可以通过特殊的配体耦合途径将雌激素兴奋剂和抑制剂区分开. 荧光共振能量转移技术中的共活化表面也可以将活细胞中天然的和人工合成的雌激素分离开^[28]. 根据荧光反应的机制, SCCoR 可以应用于活细胞中确定雌激素活性, 或者将不同种类的细胞转化为生物传感器. 压电三明治传感器将生物传感器与 17β-雌二醇和雌激素受体的复合物固定在一起, 是一种电化学传感器, 该传感器的响应值可低至 2.2 μg/L^[29].

2 内分泌干扰物的质谱分析

环境中内分泌干扰物种类繁多、浓度较低且结构多变, 对其进行检测具有很大挑战. 质谱分析法是内分泌干扰物定量分析的主要手段, 与其他方法相比, 质谱分析仪的检测限更低. 表 2 总结了采用不同仪器对环境中常见内分泌干扰物 (74 种药物, 抗血管增生药物, E1 和 E2) 检测时的检测限^[30-32]. 质谱分析手段对多种水源水中痕量或者微量有机物的检测十分有效. 根据目标污染物的性质, 可以采用不同的色谱分析手段, 如气相色谱-质谱、液相色谱-质谱、气相色谱-串联质谱等. 这些复杂的仪器可以提供非常好的定量分析的结果, 但经济投入较大, 对技术人员的要求也高. 质谱分析过程包含样品预处理和检测两个部分, 预处理的效果对测试结果的准确性影响极大, 因此, 着重介绍内分泌干扰物最常用的预处理手段——萃取技术.

表 2 不同分析方法测定水样中内分泌干扰物的检测限

方法	检测限/(ng · L ⁻¹)	文献
E - Screen	0. 27	[30]
ER - CALUX ^a	0. 14	[30]
YES ^b	0. 3 ~ 30	[30]
ELISA ^c	20 ~ 40	[30]
LC - MS/MS	0. 08 ~ 33	[31]
SPE - GC/MS	12 ~ 32	[31]
GC - MS/MS	0. 05 ~ 2. 4	[30]
SPME - HPLC ^d	0. 064 ~ 1. 2	[30]
SPE - LC/ESI - MS/MS ^e	3. 5 ~ 44	[32]

a. 雌激素化学激活荧光素酶表达法; b. 酵母菌雌激素筛选实验法; c. 酶连结免疫吸收法; d. 固相微萃取 - 高效液相色谱; e. 固相萃取 - 高效液相色谱/电喷射离子化串联质谱.

2.1 固相萃取技术 (SPE)

固相萃取技术或者液-固萃取技术均使用固相物质作为选择性吸附剂分离液相或者气相中的可吸附物质. 在固相萃取过程中, 固相吸附剂对分析物的吸附力大于样品母液, 当样品通过固相萃取柱时, 分析物被吸附在固体表面, 其他组分则随样品母液通过柱子, 最后用适当的溶剂将分析物脱下来进行分析. 美国地质调查局国家水质实验室在分析城市和工业废水中 67 种有机物 (包含内分泌干扰物和可能的内分泌干扰物) 时, 推荐以固相萃取技术作为气相色谱-质谱分析的预处理手段^[33]. 固相萃取技术也经常用作高效液相色谱的样品预处理手段^[34]. 采用聚苯乙烯-二乙烯基苯树脂型固相萃取柱对质量浓度为 4 μg/L 的样品进行富集, 体积比为 4:1 的二氯甲烷和二乙醚作为洗脱溶剂, 样品的重现性可达 (74 ± 7) %, 检测限为 0. 15 μg/L. 固相萃取技术与传统的液液萃取技术相比具有快速、高效、所需有机溶剂量少和产生有毒有害废液量少等优点.

不同的固相吸附剂、冲洗溶剂和洗脱溶剂都会影响固相萃取的效果. 选用不同的固相吸附剂, 分析结果也会有明显的差异^[35]. 图 1 列举了加标回收过程中不同类型的固相萃取柱富集不同目标污染物的结果, 由于固相萃取柱的种类不同, 样品的回收率也介于 10% ~ 90%^[36].

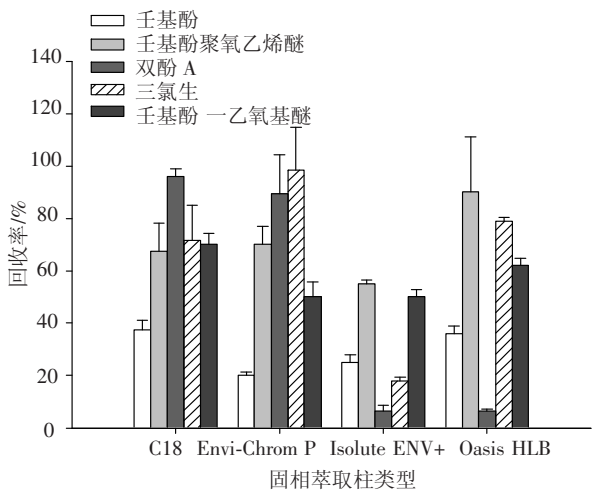


图 1 不同固相萃取柱对废水中内分泌干扰物的回收率^[36]

表 3 总结了不同类型的固相萃取柱和不同溶剂对内分泌干扰物 (壬基酚、壬基酚乙氧基化物、三氯生、双酚 A、烷基酚及其他 31 种内分泌干扰物) 预处理后的结果^[36-38]. 另外, 固相物质的吸附能力和萃取接触时间等吸附参数也会影响固相萃取的效果. 为了防止“吸附穿透”现象出现, 吸附材料的有效吸附点位应超过被吸附物质的量,

因此,固相萃取柱在使用前应先确定其吸附能力.样品通过固相萃取柱的速度应该能保证分析物和吸附材料间的最小接触时间.固相萃取柱常用的流速一般控制在 3 ~ 10 mL/min,固相萃取盘的流速通常控制在 10 ~ 100 mL/min^[39].

2.2 固相微萃取技术 (SPME)

固相微萃取技术是 20 世纪 90 年代兴起的一项新颖的样品前处理与富集技术,由加拿大 Waterloo 大学的 Pawliszyn 教授的研究小组于 1989 年首次开发,属于非溶剂型选择性萃取法.将纤维头浸入样品溶液中或顶空气体中一段时间,同时搅拌溶液以加速两相间达到平衡的速度,待平衡后将纤维头取出插入气相色谱汽化室,热解吸涂层上吸附的物质.被萃取物在汽化室内解吸后,靠

流动相将其导入色谱柱,完成提取、分离、浓缩的全过程.

固相微萃取可以分为直接萃取、顶空萃取和衍生化萃取 3 种方式.直接萃取即将固相微萃取探针直接插入水相或暴露于气体中进行萃取,要求所萃取的基质比较干净,否则有严重的基体干扰.顶空萃取是将固相微萃取纤维头置于待测物样品的上部空间进行萃取,适用于挥发性和半挥发性样品.衍生化萃取即在水溶液基质中加入衍生剂或将纤维涂层浸入适当的衍生化试剂,降低待测物极性,增加其在涂层/水或涂层/气相中的分配系数,提高固相微萃取的萃取效率.衍生化后分析物极性降低,更易于色谱分析.

表 3 不同固相萃取柱和洗脱溶剂对内分泌干扰物测定的影响

气相色谱柱	检测限/(ng·L ⁻¹)	固相萃取柱和洗脱溶剂	文献
DB-5 MS	0.03 ~ 410	固相萃取柱: C-18 Sep-Pac Oasis HLB cartridge Envi-Chrom P Isolute ENV + 柱子预处理:甲醇和 Milli-Q 超纯水 冲洗液:Milli-Q 超纯水 最后洗脱液:二氯甲烷-己烷(体积比为 4:1)	[36]
HP-5 MS	26.5	固相萃取柱:Oasis HLB cartridge 柱子预处理:乙酸乙酯,甲醇,Milli-Q 超纯水 冲洗液:甲醇-水(体积比为 5:95) 最后洗脱液:乙酸乙酯	[37]
HP-1	0.80 (未衍生)	固相萃取柱:Envi-Chrom P 柱子预处理:未知	[38]
	0.004 (衍生)	冲洗液:蒸馏水 最后洗脱液:丙酮	

固相微萃取的主要原则是将待测物质从水样中分离,并稳定在固定相中.市售固相微萃取的手柄和萃取头多种多样,萃取头表面涂覆的固相微萃取涂层可以根据待测物性质的不同进行选择^[39].前期的研究表明,吸附在硅胶涂覆的萃取头上待测物的量与水样中该物质的浓度直接相关^[40].固相微萃取的萃取头主要为纤维聚合体,对有机分子有很好的亲和力,因此,固相微萃取技术的灵敏度很高,但是仍不能完全将目标物从水样中提取出来,最后只能达到平衡模式,然后通过校正提供可靠的定量分析结果.当样品的体积远远大于稳定相的体积时,吸附在稳定相上的有机物的量和样品的体积并没有直接的相关

性^[40],该性质对现场采样尤为重要,自然水体中低浓度的有机物可以被固相萃取有效地富集,转移到实验室进行分析.固相萃取的动力学主要被液相-固相间的传质过程控制,可以通过对液相进行搅拌加速传质过程,提高萃取速率^[40].

固相微萃取技术已经成功应用于气体、水、土壤和生物样品中有机物的富集,尤其适用于水相中超微量有机物的富集和分离.苯及其同系物(BTEX)和多环芳烃(PAHs)等挥发和半挥发性有机物也适合采用固相微萃取技术进行富集^[41],而难挥发、强极性或热不稳定的有机物,即使采用极性固相微萃取涂层(如聚丙烯酸酯),其萃取效率也较低.含有酸性官能团(如-OH,-COOH,

—NH₃等)的极性有机物分子偶极距大,挥发性低,色谱行为差,GC 不能或难于直接分析,衍生化与固相微萃取的结合为其提供了可能. 衍生化用非极性基团封闭极性官能团,将极性待测物转换为弱极性待测物,提高了挥发性,也提高了固相微萃取的萃取效率和色谱检测的灵敏度.

固相微萃取衍生化的方法可分为样品基体内衍生化、纤维涂层内衍生化、GC 进样口衍生化. 衍生剂的选择和衍生化的位置均可以对内分泌干扰物的测定结果产生明显影响. 如测定水样中烷基酚和双酚 A 的过程中,采用聚合物涂覆的横向纤维萃取头进行萃取,在 GC/MS 进样口用双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA) 作为衍生剂对样品进行衍生,结果表明,双酚 A 的检测限为 0.07 ~ 2.34 ng/L,线性测定范围为 0.01 ~ 15 µg/L^[42-43]. 样品基体内衍生和顶空 SPME/GC/MS 技术也应用于壬基酚、乙氧基壬基酚及其酸性代谢产物的测定,研究者比较了直接固相微萃取后衍生和顶空固相萃取后基质内衍生的实验结果,及不同衍生试剂和不同材料的纤维涂层的影响^[44-45].

固相微萃取技术除了受固相萃取柱本身化学性质的影响外,还受其他的操作条件的影响,如样品搅拌速度、达到平衡需要的时间和温度等^[46]. 离子强度、样品组成和操作条件等因素都可以作为固相微萃取需要优化的条件^[44]. 天然水体和污水中有机物和胶体的存在都会影响固相萃取过程中内分泌干扰物的回收率^[47]. 和其他方法相比,固相微萃取技术可以实现自动化,使用的溶剂量少,萃取头上的纤维经过适当的保护可以重复使用或者循环使用^[48],是非常出色的预处理手段.

2.3 液相微萃取技术(LPME)

液相萃取或者液-液萃取(LLE)是富集水样中有机物常用的手段. 该方法所需有机溶剂量较大,并且后续需要浓缩过程,产生废水的量也很大,因此,发展了液相微萃取技术、溶剂液相微萃取技术(SME)或者单液滴微萃取技术(SDME)等^[49-50]. 文献[51]在检测河水中双酚 A 时采用液相微萃取技术,微注射器将一滴溶剂直接置于被搅拌的水样中,待萃取结束后将萃取溶剂直接在气相色谱进样口衍生化,然后进入 GC/MS 分析. 通过比较不同条件下样品的出峰面积大小,确定合适的萃取参数,包括溶剂的选择、暴露时间和水样的搅拌速度等. 当选用甲苯作为溶剂时,双酚 A 的检测限和定量限分别为 2 和 10 ng/L.

液相微萃取的最大技术难题是单滴萃取溶剂

在扰动水样中停留时间的控制. 在部分水样萃取过程中,由于搅拌的剪切力或者有机溶剂部分溶于水,萃取溶剂随着接触时间的增长,体积会越来越小. 改进的液相微萃取技术使用横向纤维来保护微量的萃取溶剂,防止其体积减小,如采用充满有机溶剂的多孔聚丙烯横向纤维在水样中直接进行萃取,将完成萃取后的溶剂和双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA)直接在 GC/MS 进样口衍生化,该方法的检测限和定量限分别为 5 ~ 15 和 12 ~ 26 ng/L^[52]. 液相微萃取技术也是水样中内分泌干扰物简单、快速和高效的预处理方法.

3 生物-质谱串联技术

质谱法可以很好地对内分泌干扰物定量,但是资金投入高,且无法确定内分泌干扰物的雌激素活性^[53]. 生物基础实验法需要的荧光分析仪和分光光度计价格较低,但定量分析的灵敏度比质谱法低^[30]. 为了实现内分泌干扰物定性和定量分析,生物学基础实验法和质谱法串联技术应运而生,即生物定向的化学分析法(BDCA)^[31]. 在该分析方法中,样品经过酵母菌雌激素筛选实验(YES)分离后,进行雌激素活性的检测. 具体的化学形态分析由 LC-MS/MS 确定^[31,54]. 另外一种方法是生物定向的分级法,即细胞增殖的雌激素筛选方法——E-screen 实验联合化学分级技术^[55]. 此外,重组基因酵母(RYA)技术联合 LC/MS 分析技术也有应用^[56].

4 结论与展望

目前,生物基础实验法是确定内分泌干扰物对动物和人体影响的最好方法. 当环境中存在多种内分泌干扰物同时存在时,生物基础实验法可以反映环境中内分泌干扰物的整体雌激素效应,如协同效应或者拮抗作用. 质谱法对于单一内分泌干扰物定量分析的灵敏度和准确度都非常高,整个分析过程通常包含萃取预处理和仪器测试分析两个部分. 萃取预处理阶段对整个检测结果的成功与否起重要作用,常规的液液萃取发展出了固相萃取技术、固相微萃取技术和液相微萃取技术等. 近年也开发出了将生物法与质谱法相结合的检测技术,该技术兼具两种方法的优势,但经济投入也较高.

随着工业合成原料种类与日俱增,鉴别这些新兴化合物是否为内分泌干扰物将是一项长期而艰巨的任务;同时,国家也急需拟定内分泌干扰物名单,为公众安全提供保障. 未来内分泌干扰物的

研究主要可以从以下几个方面开展:减少已知内分泌干扰物的源头,确定敏感群体的最大暴露剂量,污染区域的处理和修复及其内分泌干扰物在大区域环境中的迁移转化机制等. 内分泌干扰物的检测方法则朝着不同检测手段联合应用的趋势发展,达到同时定量和同时确定生物毒性的目的.

参考文献:

- [1] BENOTTI M J, TRENHOLM R A, VANDERFORD B J, *et al.* Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U. S. drinking water [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43:597 – 603.
- [2] LIU Jingliang, WANG Renmin, HUANG Bin, *et al.* Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents [J]. *Environmental Pollution*, 2012, 162: 325 – 331.
- [3] CHANGA H S, CHOOA K H, LEEB B, *et al.* The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water [J]. *Journal of Hazardous Material*, 2009, 172:1 – 12.
- [4] 胡玲,高乃云. Fenton 试剂降解内分泌干扰物双酚 A 的研究[J]. *中国给水排水*, 2011, 27(7):80 – 86.
- [5] COMBALBERT S, BELLET V, DABERT P. Fate of steroid hormones and endocrine activities in swine manure disposal and treatment facilities [J]. *Water Research*, 2012, 46(3):895 – 906.
- [6] KUMAR A K, REDDY M V, CHANDRASEKHAR K, *et al.* Endocrine disruptive estrogens role in electron transfer: bio-electrochemical remediation with microbial mediated electrogenesis [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 104: 547 – 556.
- [7] FRONTISTIS Z, XEKOUKOULOTAKIS N P, HAPESHI E, *et al.* Fast degradation of estrogen hormones in environmental matrices by photo-Fenton oxidation under simulated solar radiation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 178:175 – 182.
- [8] SARRIA M P, SOARES J, VIEIRA M N, *et al.* Rapid-behaviour responses as a reliable indicator of estrogenic chemical toxicity in zebrafish juveniles [J]. *Chemosphere*, 2011, 85(10): 1543 – 1547.
- [9] LIU Jingliang, WANG Renmin, HUANG Bin, *et al.* Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China [J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(10): 2815 – 2822.
- [10] JANINA S, JAROSLAW M, ALEKSANDRA S, *et al.* Photoperiod modulates access of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) to the brain and its effect on gonadotropin and thyroid hormones in adult ewes [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 78:336 – 343.
- [11] 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(7): 1352 – 1362.
- [12] LIU Zehua, KANJO Y, MIZUTANI S, *et al.* Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment-physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: a review [J]. *Science of The Total Environment*, 2009, 407: 731 – 748.
- [13] CULLINAN M P, PALMER J E, CARLE A D, *et al.* Long term use of triclosan toothpaste and thyroid function [J]. *Science of The Total Environment*, 2012, 416:75 – 79.
- [14] SIMONE G, JOERG O. Widespread endocrine activity in river sediments in Hesse, Germany, assessed by a combination of in vitro and in vivo bioassays [J]. *Journal of Soil and Sediments*, 2012, 12(2): 252 – 264.
- [15] LEGLER J, ZEINSTRA L M, SCHUITEMAKER F, *et al.* Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36:4410 – 4415.
- [16] MUNCKE J. Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: an updated review of exposure, effect and risk assessment [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 127:1 – 2.
- [17] BERGAMASCO A M, ELDRIDGE M, SANSEVERINO J, *et al.* Bioluminescent yeast estrogen assay (BLYES) as a sensitive tool to monitor surface and drinking water for estrogenicity [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, 13(11):3288 – 3293.
- [18] HAYES T, HASTON K, TSUI M, *et al.* Feminization of male frogs in the wild: water-borne herbicide threatens amphibian populations in parts of the United States [J]. *Nature*, 2002, 419: 895 – 896.
- [19] MICAEL J, REIS – HENRIQUES M A, CARVALHO A P, *et al.* Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environment International*, 2007, 33(8):1035 – 1039.
- [20] SOARES A, GUIEYSSE B, JEFFERSON B, *et al.* Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters [J]. *Environment International*, 2008, 34(7):1033 – 1049.

- [21] ISABEL C, SERGIO L, ALICIA G A. 17 alpha-Ethynylestradiol alters the immune response of the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) both in vivo and in vitro [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2012, 36(3):547–556.
- [22] FILBY A L, PAULL G C, SEARLE F, *et al.* Environmental estrogen-induced alterations of male aggression and dominance hierarchies in fish: a mechanistic analysis [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(6):3472–3479.
- [23] PAULINA D, ECKARDT T. Reporter zebrafish: endocrine disruption meets estrogen signaling [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(7):2542–2545.
- [24] HOUCK K A, KAVLOCK R J. Understanding mechanisms of toxicity: insights from drug discovery research [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 227(2):163–178.
- [25] PETERS R E M, COURTENAY S C, HEWITT L M, *et al.* Effects of 17 alpha-ethynylestradiol on early – life development, sex differentiation and vitellogenin induction in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) [J]. *Marine Environmental Research*, 2010, 69(3):178–186.
- [26] XIA Wei, LI Yuanyuan, WAN Yanjian, *et al.* Electrochemical biosensor for estrogenic substance using lipid bilayers modified by Au nanoparticles [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, 25(10):2253–2258.
- [27] RODRIGUEZ – MOZAZ S, REDER S, LOPEZ A M J, *et al.* Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isopropylturon, and atrazine in natural waters by the River ANALyzer (RIANA), an optical immunosensor-optical immunosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2004, 19:633–640.
- [28] FERNANDO P, BEATRIZ D, JOSE M P, *et al.* Imaging local estrogen production in single living cells with recombinant fluorescent indicators [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 26(5):2147–2153.
- [29] RICARDO R M, BARUZZI A M, GARAY F, *et al.* Mathematical modeling and experimental results of a sandwich-type amperometric biosensor [J]. *Sensors and Actuators B – Chemical*, 2012, 162(1):284–291.
- [30] STEINER L D, BIDWELL V J, DI H J, *et al.* Transport and modeling of estrogenic hormones in a dairy farm effluent through undisturbed soil lysimeters [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(7):2341–2347.
- [31] ROSTKOWSKI P, HORWOOD J, SHEARS J A, *et al.* Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 45(24):10660–10667.
- [32] REBECA L S, MIRA P, DAMIA B, *et al.* Development of a fast instrumental method for the analysis of pharmaceuticals in environmental and wastewaters based on ultra high performance liquid chromatography (UHPLC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) [J]. *Chemosphere*, 2011, 85(8):1390–1399.
- [33] SHI Xizhi, LIU Jinghua, SUN Aili, *et al.* Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1227:60–66.
- [34] CHEN H C, DING W H. Determination of aqueous fullerene aggregates in water by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1223:15–23.
- [35] BRAVO J C, GARCINUNO R M, FERNANDEZ P, *et al.* A new molecularly imprinted polymer for the on-column solid-phase extraction of diethylstilbestrol from aqueous samples [J]. *Anal Bioanal Chem Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388:1039–1045.
- [36] GATIDOU G, THOMAIDIS N S, STASINAKIS A S, *et al.* Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1138:32–41.
- [37] ZHANG Hongchang, YU Xuejun, YANG Wenchao, *et al.* MCX based solid phase extraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 31 endocrine-disrupting compounds in surface water of Shanghai [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879(28):2998–3004.
- [38] NIU Yumin, ZHANG Jing, WU Yongning, *et al.* Simultaneous determination of bisphenol A and alkylphenol in plant oil by gel permeation chromatography and isotopic dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(31):5248–5253.
- [39] YU J C C, HRDINA A, MANCINI C, *et al.* Molecularly imprinted polypyrrole encapsulated carbon nanotubes in stainless steel frit for micro solid phase extraction of estrogenic compounds [J]. *J Nanoscience and Nanotechnology*, 2007, 7(9):3095–3103.
- [40] HU Yuling, WANG Yangyang, HU Yufei, *et al.* Liq-

- uid-liquid-solid microextraction based on membrane-protected molecularly imprinted polymer fiber for trace analysis of triazines in complex aqueous samples [J]. *Journal of Chromatograph A*, 2009, 1216(47):8304 – 8311.
- [41] 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(2): 384 – 390.
- [42] YU Qiongwei, MA Qiao, FENG Yuqi, *et al.* Temperature-response polymer coating for in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography [J]. *Talanta*, 2011, 84(4):1019 – 1025.
- [43] SALGUEIRO G N, CONCHA G E, TURNES C I, *et al.* Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1223:1 – 8.
- [44] MUDIAM M K R, JAIN R, DUA V K, *et al.* Application of ethyl chloroformate derivatization for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol-A in water and milk samples [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 401(5):1695 – 1701.
- [45] HUANG Kuanpin, WANG Guanren, HUANG Baoyu, *et al.* Preparation and application of ionic liquid-coated fused-silica capillary fibers for solid-phase microextraction [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 1/2:42 – 47.
- [46] DJOZAN D, EBRAHIMI B. Preparation of new solid phase micro extraction fiber on the basis of atrazine-molecular imprinted polymer; application for GC and GC/MS screening of triazine herbicides in water, rice and onion [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 616(2): 152 – 159.
- [47] ZHU Feidie, CHOO K H, CHANG H S, *et al.* Interaction of bisphenol A with dissolved organic matter in extractive and adsorptive removal processes [J]. *Chemosphere*, 2012, 87(8):857 – 864.
- [48] WEN Huajing, BERGENDAHL J A, THOMPSON R W. Removal of estrone from water by adsorption on zeolites with regeneration by direct UV photolysis [J]. *Environmental Engineering Science*, 2009, 26(2):319 – 326.
- [49] MOJTABA T S, YADOLLAH Y, HOSEIN N M, *et al.* Determination of residual monomers in latex by head-space hollow fiber protected liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography [J]. *Polymer Testing*, 2012, 31(2):297 – 303.
- [50] GUO Liang, LEE H K, LAMBROPOULOU D A, *et al.* One step solvent bar microextraction and derivatization followed by gas chromatography – mass spectrometry for the determination of pharmaceutically active compounds in drain water samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1235:26 – 33.
- [51] ZHOU Qingxiang, GAO Yuanyuan, XIE Guohong. Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector [J]. *Talanta*, 2011, 85(3):1598 – 1602.
- [52] KIM H Y, LEE J, LEE M J. The application of hollow fibre-liquid phase micro-extraction on the bioassay experiment of oestrogen chemicals [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2012, 92(3):255 – 267.
- [53] 王琳, 董秉直, 高乃云. 超滤去除水中内分泌干扰物(BPA)的效果和影响因素 [J]. *环境科学*, 2007, 28(2):329 – 334.
- [54] DENIER X, COUTEAU J, BAUDRIMONT M, *et al.* In vitro study of the effects of cadmium on the activation of the estrogen response element using the YES screen [J]. *Marine Environmental Research*, 2008, 66:108 – 110.
- [55] OH S M, RYU B T, CHUNG K H. Identification of estrogenic and antiestrogenic activities of respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed fractionation [J]. *Archives of Pharmacal Research*, 2008, 31(1):75 – 82.
- [56] FREIRE C, LOPEZ-ESPINOSA M J, FERNANDEZ M, *et al.* Prenatal exposure to organochlorine pesticides and TSH status in newborns from Southern Spain [J]. *Science of The Total Environment*, 2011, 409(18): 3281 – 3287.

(编辑 刘 彤)