

雌酮的氯化产物及其内分泌干扰作用活性^{*}

程水杰 胡建英^{**}

(北京大学环境学院, 北京, 100871)

摘 要 利用固相萃取-LC/ESI-MS 分析测定雌酮及其在氯气消毒过程中产生的副产物, 结果表明, 雌酮容易和次氯酸发生反应, 并检出了包括一氯雌酮、二氯雌酮在内的 4 种副产物. 用酵母双杂交方法对副产物的内分泌干扰活性进行了测试, 发现副产物也具有内分泌干扰作用.

关键词 雌酮, 内分泌干扰物质, 酵母双杂交.

在众多的内分泌干扰物质中, 自然雌激素由于在极低浓度下显示出极强的内分泌干扰作用, 如雌二醇浓度在 $1-10\text{ng l}^{-1}$ ^[1], 合成雌激素炔雌醇的浓度在 0.1ng l^{-1} ^[2, 3] 时, 就会使一些野生雄性鱼类出现雌性化现象, 因此, 成为环境领域比较关注的物质. 由于目前有关雌激素的分析方法还不是很成熟^[4], 有关此类物质的环境污染调查和预测数据表明^[5, 6], 内源性雌激素雌二醇和雌酮广泛存在于天然水体中.

人类的内源性雌激素的暴露途径之一是饮用水. 考虑到雌激素雌二醇和雌酮广泛存在于天然水体中, 有必要对饮用水处理过程中雌激素的残留量及其在处理过程中的行为进行研究, 酚类物质如壬基酚和双酚A 一般很容易和次氯酸在内的许多饮用水消毒剂进行反应^[7, 8], 因此, 为了正确地评价自来水中由雌激素引起的内分泌干扰作用对人体健康的危害性, 有必要对雌激素在饮用水氯气消毒过程中产生的副产物进行研究.

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

雌酮购自日本和光公司. 次氯酸钠 (化学纯, 北京西中化工厂).

Waters 2690 Separations Module; DiamonsilTM (钻石) C₁₈ (150 × 2.1mm × 5 μm, 迪马公司); HZQ-C 空气浴振荡器 (哈尔滨东明医疗仪器厂); EASYpure UV 超纯水计 (Fisher 公司); Varian SPS 24 固相萃取 (SPE) 真空装置; 水道机工 (Tokyo Japan) 余氯测定仪; KQ-600B 型超声波清洗器 (40kHz).

1.2 消毒处理试验

配制 0.05mg l^{-1} 的雌酮溶液 4.0L, 吸取 500ml 水样作为反应前的样品. 然后加入

2003 年 1 月 18 日收稿.

^{*} 国家杰出青年科学基金项目 (49925103); 基金委优秀创新群体 (40024101); 环保“863”(2001AA646010-5).

^{**} 通讯联系人, hujy@urban.pku.edu.cn.

NaClO 稀释液 (7% 次氯酸钠 1ml, 稀释 50 倍) 2.8ml, 使 NaClO 的浓度为 1.45mg l^{-1} (接近实际饮用水消毒过程中的 NaClO 浓度 1.0mg l^{-1}), 用磷酸调 pH 值为 7.5 (天然水体的 pH 值一般在中性), 并分别于反应时间 10, 30, 180, 420min 各取 500ml, 测定余氯后, 加入 1ml 的 $1\text{mol l}^{-1}\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 消除余氯.

1.3 水样的测定

依次用 10ml 乙醚、10ml 甲醇、10ml 水活化 C_{18} 固相萃取柱, 再以 $10\text{--}15\text{ml min}^{-1}$ 的速度进样浓缩上述溶液. 萃取液用乙醚定容至 1ml, 分出 0.8ml, 氮气吹干后, 再用乙醚定容至 0.2ml, 用于 LC-MS 测定. 剩余 0.2ml 溶液氮气吹干后, 用 DMSO 定容至 0.02ml, 用于内分泌干扰活性的测定.

培养基为去除了亮氨酸和色氨酸的 SD 培养基, 用酵母双杂交法测定样品的活性. 双杂交酵母基因工程菌株 Y190 由日本大阪大学西川淳一博士惠赠, 基本操作方法见文献 [8].

2 结果与讨论

2.1 LC-ESFMS 法测定雌酮的氯消毒副产物

图 1(a) 表示反应前 (0min) 500ml 反应液的 LC/ESFMS 色谱图. 出现在保留时间 23.6min 处的物质为雌酮, 其质谱图如图 2(a) 所示. 图 1(b) 表示反应时间为 10min 氯气反应混合物的 LC/ESFMS 色谱图. 如图所示, 雌酮很快和氯气发生反应生成各种消毒副产物, 余氯从反应前的 1.45mg l^{-1} 降低到 1.35mg l^{-1} . 根据图 2(c) 和 (e) 的质谱图可以确认出现在保留时间为 27.2min 和 30.8min 处的物质分别是一氯雌酮和二氯雌酮. 图 2(b) 表示出现在保留时间为 23.86min 处 A 物质的质谱图. 从图中可以看出, 该物质的分子离子峰为 m/z 353, 而 m/z 317 的离子峰很可能为 m/z 353 脱掉一个 Cl 的碎片峰. 根据分子离子峰及氯气和酚类物质可能的反应机理, 我们推测此物质可能是图 2(b) 中的 A 物质. 图 2(d) 则对应于保留时间为 28.86min D 物质的质谱图, 其分子离子峰 m/z 387, 碎片离子 m/z 351 和 m/z 335 可能对应于 $(\text{M}-\text{Cl}-2\text{H})^-$ 和 $(351-\text{CH}_3-2\text{H})^-$. 从这些结构信息, 推断此峰是图 2(d) 所示的 D 物质.

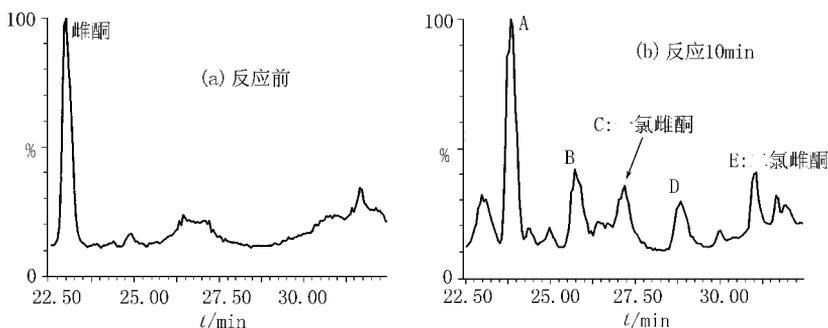


图 1 雌酮氯化前后的 LC/ESFMS 色谱图

Fig. 1 LC/ESFMS chromatogram of estrone before and after chlorination

对反应时间 180min 和 420min 后的反应液也进行了 LC-MS 分析, 结果显示: 除了各峰的面积略有变化外, 没有生成其它新的化学物质, 余氯浓度也几乎保持在反应 10min 时的浓度水平. 另外, 出现在保留时间为 25.74min 的 B 物质目前还无法推测其结构, 有待进一步定性.

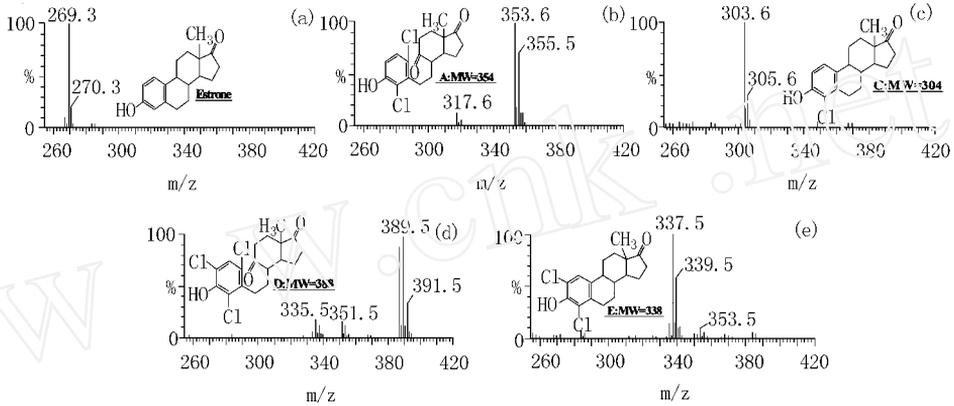


图 2 反应副产物的 LC/ESFMS 质谱图

Fig. 2 LC/ESFMS mass spectra of by-products of estrone

2.2 副产物的内分泌干扰作用

图 3 是不同反应时间雌酮反应产物内分泌干扰作用活性的测试结果. 由于反应混合物中物质的浓度未知, 因此, 剂量反应曲线图中的横轴以浓缩倍数表示. 从图 3 可以发现: 反应 10min 后, 反应液中尽管没有雌酮残留但是其活性强度和反应前相比几乎不变, 虽然出现活性的浓缩倍数约比反应前高. 这一结果表明反应产物中也存在着活性强度比较高的副产物. 反应 30min 和 180min 后溶液的活性有了很明显的降低, 而反应 420min 后的活性和反应 30min 和 180min 时相比没有明显的降低, 表示 180min 以后剩下的物质不容易和 NaClO 反应, 而且这些剩下的副产物中的某些物质具有内分泌干扰作用活性.

由于没有标准样品, 无法对所有的副产物进行定量. 雌酮及其反应产物的峰面积随反应时间变化的情况见图 4.

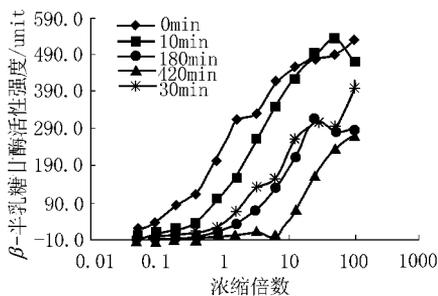


图 3 不同氯化时间反应液的内分泌干扰作用活性

Fig. 3 Estrogenic activity of aqueous chlorination solution of estrone

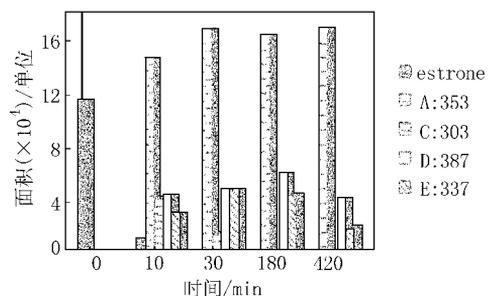


图 4 反应产物峰面积随反应时间的变化

Fig. 4 Variation of area of each by-products with chlorination time

由图 4 可见, 反应时间 10min 时的副产物为一氯雌酮(C), 二氯雌酮(E)和 B, C, D, 而主要产物为分子量 353 的 A 物质. 随着反应的进行, 一氯雌酮(C)和 B 物质消失, A, D 和 E 的生成量几乎没有太大变化, 而成为最终副产物. 据此推断图 4 中, 反应时间为 420min 中依然存在的内分泌干扰活性强度可能是由于 A, D 和 E 三种产物中的一种作用或者是它们协同作用的结果. 而且从一个侧面证明 10min 后的反应产物显示出较高活性强度主要是一氯雌酮(C)或者 B 物质的贡献所致.

综上所述, 雌酮很容易与次氯酸发生反应生成一氯雌酮, 二氯雌酮等 5 种副产物. 酵母双杂交实验表明这些副产物也具有内分泌干扰作用.

参 考 文 献

- [1] Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C et al., Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. *in Vivo* Responses in Trout and Roach. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, **32** 1559
- [2] Purdom C E, Hardiman P A, Bye V J et al., Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works. *Chem. Ecol.*, 1994, **8** 275
- [3] Hansen P D, Dizer H, Hoek B et al., Vitellogenin-a Biomarker for Endocrine Disruptors. *Trends Anal. Chem.*, 1998, **448**: 17
- [4] 常红, 胡建英, 邵兵, 固相萃取-LC-MS 法检测水中痕量雌激素. *环境化学*, 2003, **22** (4): 400—403
- [5] Baronti C, Curini R, D'Ascenzo Giuseppe, Monitoring Natural and Synthetic Estrogens at Activated Sludge Sewage Treatment Plants and in Receiving River Water. *Environ. Sci. Technol.*, 2000, **34** (24) 5059—5066
- [6] 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. *The Science of the Total Environment*, 2000, **256** 163—173
- [7] HU J Y, Aizawa T, Ookubo S, Products of Aqueous Chlorination of Bisphenol A and their Estrogenic Activity. *Environ. Sci. Technol.*, 2002, **36** 1980—1987
- [8] HU J Y, Xie G H, Aizawa T, Products of Aqueous Chlorination of Nonylphenol and their Estrogenic Activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, **21** (10) 2034—2039

PRODUCTS OF AQUEOUS CHLORINATION OF ESTRONE AND THEIR ESTROGENIC ACTIVITY

CHENG Shui-jie HU Jian-ying

(College of Environment Sciences, Peking University, Beijing, 100871)

ABSTRACT

Because estrone elicits strong estrogenic disrupting action, its potential risk has become one of important environmental issues. In this study, the experimental results acquired by analyzing estrone and its products of aqueous chlorination using SPELC/ESFMS method indicate that estrone is apt to react with HClO, and the four by-products including monochloro-estrone and dichloro-estrone were identified. Besides, the estrogenic activity of aqueous chlorination solution of estrone at 10, 30, 180 and 420min were detected by using yeast two-hybrid system, and the results show that the by-products of estrone chlorination also elicit estrogenic activities.

Key words: estrone, endocrine disruptors, yeast two-hybrid.