

文章编号:1000-582X(2011)05-105-07

## 响应曲面法在类固醇雌激素 HPLC-MS-MS 定量分析中的应用

万巧玲<sup>1</sup>, 阳春<sup>1</sup>, 张智<sup>1</sup>, 廉鹏<sup>1</sup>, 易中宏<sup>2</sup>

(1. 重庆大学 三峡库区生态环境教育部重点实验室 重庆 400045;

2. 重庆医药工业研究院有限责任公司 重庆 400061)

**摘要:**雌酮(E1)、17 $\beta$ -雌二醇(E2)和17 $\alpha$ -乙炔基雌二醇(E2)是雌情活力最强的3种类固醇雌激素。通过响应曲面法(RSM)优化了3种雌激素在高效液相色谱-串联质谱联用(HPLC-MS-MS)检测方法中的多离子监测反应(MRM)条件,获得E1、E2和EE2的最优碎片电压分别为205.0、196.0和182.0 V,最优碰撞能分别为43.0、51.0和54.0 V。配合固相萃取(SPE)预处理技术,采用HPLC-MS-MS内标检测方法检测了重庆主城区嘉陵江水样中E1、E2和EE2的浓度。3者在该方法中的定量检测限分别为0.5、0.4和0.1 ng/L。

**关键词:**污水分析;液质联用;雌酮;17 $\beta$ -雌二醇;17 $\alpha$ -乙炔基雌二醇;响应曲面法;

中图分类号:X830.2

文献标志码:A

## Application of response surface method in the quantification for steroid estrogens using HPLC-MS-MS

WAN Qiao-ling<sup>1</sup>, YANG Chun<sup>1</sup>, ZHANG Zhi<sup>1</sup>, LIAN Peng<sup>1</sup>, YI Zhong-hong<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Three Gorges Reservoir Region's Eco-Environment, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400045, P. R. China;

2. Chongqing Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Chongqing 400061, P. R. China)

**Abstract:** Estrone(E1), 17 $\beta$ -estradiol(E2) and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol(EE2) exhibit the highest estrogenic potential. A HPLC-MS-MS analysis method using internal standard is established with the multiple reaction monitoring (MRM) model. Further more, the fragment voltages and collision energies in the MRM model are optimized by response surface method (RSM). The optimal fragment voltages of E1, E2 and EE2 are 205.0, 196.0 and 182.0 V respectively and the collision energies are 43.0, 51.0 and 54.0 V. The established method followed the two-step solid phase extraction (SPE) is then applied for the quantification of E1, E2 and EE2 in the water samples collected from a activated sludge process sewage treatment work and Jialing River at the urban section of Chongqing City. The detection limits of E1, E2 and EE2 are 0.5, 0.4 and 0.1 ng/L.

**Key words:** sewage analysis; HPLC-MS-MS; estrone; 17 $\beta$ -estradiol; 17 $\alpha$ -ethinylestradiol; response surface method

收稿日期:2011-01-03

基金项目:国家自然科学基金(50808183);重庆市自然科学基金(CSTC2008BB7047, CSTC2008BB030)

作者简介:万巧玲(1982-),女,重庆大学博士生,主要从事内分泌干扰物研究。

阳春(联系人),男,重庆大学副教授,主要从事内分泌干扰物研究,(E-mail) eric. chun. yang@163. com。

污水厂出水中高于干扰阈值的雌情化物质是造成河流中部分水生生物雌性化的主要原因,雌酮(E1)、雌二醇(E2)和乙炔基雌二醇(EE2)这 3 种类固醇雌激素雌情活力最强,是造成污水厂出水具雌情活力的主要物质。欧盟在 118 种内分泌干扰物中将其列为优先研究的物质,这 3 种物质亦即将被英国环境质量标准限制排放,年均总雌激素浓度排放标准拟为 1.0 ng/L<sup>[1-2]</sup>。

E1、E2 和 EE2 的检测手段目前主要有以重组基因酵母检测法为代表的生物检测方法<sup>[3-4]</sup>;以 ELISA 为代表的免疫检测方法<sup>[5-7]</sup>和以色谱质谱联用为代表的化学检测方法<sup>[8-10]</sup>。生物检测法可检测水样的整体雌情活力,但难以定量检测雌情化物质各自的存在浓度;免疫检测法灵敏度高,但分析结果的假阳性亦较高;色谱与单极质谱联用法可获得可靠的结果,但在环境介质中仍难以达到低于 1.0 ng/L 的检测限,且质谱分析干扰峰较多。采用多级质谱则可减少干扰峰对分析的影响,提高精确度。类固醇雌激素挥发性较差,用气相色谱(GC)检测时须进行衍生化以保证色谱分离效果<sup>[9]</sup>,采用液相色谱则可以省去这一步骤,从而可以降低分析物的损失。在具有相关分析设备的条件下,高效液相色谱与多级质谱联用的检测法应是针对复杂环境介质中痕量类固醇雌激素定量分析的一种较优的方法。

由于液质联用定量分析复杂环境介质中的雌激素,目前尚无可供参考的标准方法,其质谱检测条件多采用经验值或正交实验方法加以确定。正交方法实验次数多,且回归误差大<sup>[11]</sup>,响应曲面优化方法(RSM)则可克服上述不足。RSM 法是一种数据分析方法,它以回归方程作为函数估算的工具,在多因子试验中用多项式拟合因子与响应值之间的关系,并将其函数化,从而可对函数的响应面进行分析,研究因子与响应值之间的相互关系。RSM 法是一种优化反应条件和操作参数的有效方法,可建立连续变量曲面模型,对影响过程的因子水平及交互作用进行优化和评价,已广泛应用于化学化工、生物、食品等领域<sup>[12-15]</sup>,但尚未有采用 RSM 法对雌激素检测条件进行优化的报道。笔者利用 RSM 法对 E1、E2 和 EE2 3 种雌激素的高效液相色谱-串联质谱连用(HPLC-MS-MS)中的多反应离子监测(MRM)检测条件进行了曲面优化,获得了最佳检测条件,并配合固相萃取(SPE)预处理,成功地定量分析了采集于重庆主城嘉陵江段的河水样和某污水厂的进出水水样中的 E1、E2 和 EE2 浓度。

中国目前对于雌激素内分泌干扰物的研究较

少,但由于中国城市人口密度大,污水处理率和处理程度相对于发达国家仍较低,在众多河流的城市河段可能存在较高的雌情化风险,珠江广州段和松花江哈尔滨段已经有该类物质污染的报道<sup>[16-19]</sup>,因此针对该类物质在中国水环境中的污染状况、迁移和变化规律进行相关研究是必要的。HPLC-MS-MS 内标检测法的建立将为三峡库区的类固醇雌激素内分泌干扰物的深入研究提供可靠的分析手段,也可为中国在此领域的相关研究提供借鉴。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和材料

高纯度的目标物质雌酮(E1)、雌二醇(E2)、乙炔基雌二醇(EE2)、内标物质氘代雌酮(E1-d4)、液相色谱级纯水、甲醇、正己烷及二氯甲烷均购自 Sigma 公司。雌激素标准储备溶液用甲醇溶剂按照 1.0 g/L 配置,工作溶液则用甲醇根据需要将储备溶液稀释制成。C<sub>18</sub> 小柱(Alltech, 200 mg/4 mL, 50 kPa)、NH<sub>2</sub> 小柱(Alltech, 200 mg/4 mL, 50 kPa)。

### 1.2 水样的采集

2009 年 4 月,分别采集了重庆主城区嘉陵江磁器口段(清水溪汇入口下游 100.0 m)河水水样和某活性污泥工艺污水厂(出水收纳水体为长江)进出水水样。污水厂进出水水样采用自动取样机在各取样点从 7:00 到 19:00 每小时取样 1 次,制成 12.0 h 混合样。棕色玻璃取样瓶中预先加入盐酸和硝酸铜并在低温避光条件下运输,以保证雌激素在取样和样品运送过程中无降解损耗,低温 4 ℃ 保存<sup>[20]</sup>。

### 1.3 水样的预处理

每 1.0 L 水样中均加入 20.0 ng/mL 的内标 E1-d4 甲醇溶液各 1.0 mL。为防堵塞,除标准样和空白样,其他水样先使用离心分离机分离(3 000 r/min),再在真空泵的抽吸下用 0.45 μm 滤膜(Whatman)过滤上清液。因雌激素具有憎水性,离心分离沉淀物和过滤拦截物均用甲醇清洗,并将清洗液加至滤液中以避免分析物的损失<sup>[21]</sup>。

第 1 步固相萃取采用 C18 小柱。萃取前依次通过 5.0 mL 甲醇和 10.0 mL 纯净水以活化柱体。当所有水样通过吸附柱后,用 5.0 mL 纯净水清洗柱体并继续抽吸 1.0 min,然后再用 5.0 mL 正己烷清洗柱体。清洗后的萃取柱用 5.0 mL 二氯甲烷洗提,并收集至小试管中。小试管置于 40.0~50.0 ℃ 的恒温水浴并用氮气吹干,后加入 1.0 mL 甲醇将附着物重新溶解。

第 2 步固相萃取采用 NH<sub>2</sub> 小柱,依次通过

5.0 mL 甲醇和 5.0 mL 纯水活化柱体。重新溶解的 1.0 mL 甲醇溶液通过柱体后用另一干净小试管收集,然后再用 5.0 mL 甲醇清洗柱体,并收集清洗液获得 6.0 mL 甲醇溶液。吹干之后,将残留物用 1.0 mL 甲醇重新溶解,用于 HPLC-MS-MS 分析<sup>[22]</sup>。

#### 1.4 试验条件的探索与样品的分析

用标准储存液配制包含 E1、E2、EE2 和 E1-d4 各 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的甲醇混合溶液进行检测条件的探索和优化。

高效液相色谱仪采用 Agilent 1100 系列,质谱仪采用 API5000 三重四极杆质谱仪并采用电喷雾离子源 (ESI)。色谱条件-色谱柱: Phenomenex LUNA C<sub>18</sub>(2)(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 离子源: 电喷雾离子源(阴离子模式); 进样体积: 20  $\mu\text{L}$ ; 载气温度 (Gas Temp): 300  $^{\circ}\text{C}$ ; 载气流速 (Gas Flow): 11 L/min; 雾化气压 (Nebulizer): 55 psi (1 psi=6.895 kPa); 毛细管电压 (Capillary): 4 000 V; 流动相: A 为 0.1% 的氨水溶液 (V/V), B 为乙腈纯溶液 (均采用体积分数), 流速 1 mL/min; 洗脱梯度为 0~10.0 min=10% B; 18.0 min=50% B; 24.0 min=90% B; 28.0 min=10% B, 柱平衡 8.0 min<sup>[8-10]</sup>。

三重四级杆质谱运行实验中,采用多反应离子监测 (MRM) 模式,检测离子选择结果如表 1 所示。分别针对 E1、E2 和 EE2 3 种物质做单因素试验,考察碎片电压 (Fragment) 与碰撞能 (Collision energy) 2 主要因素对 MRM 检测结果的影响。每个试验进行 3 次重复,取其平均值进行分析。通过单因素实验结果首先确定模型探测范围,再采用 Design-expert 7.1.3 软件,应用响应曲面法 (RSM) 设计双因子交互效应分析,确定并验证 MRM 最佳实验条件。

表 1 MRM 模式中雌激素检测离子

化合物	离子跃迁(1) *	离子跃迁(2) * *
	$/(m \cdot z^{-1})$	$/(m \cdot z^{-1})$
E1	269.2/143.0	269.2/145.0
E1-d4	273.2/147.0	273.2/149.0
E2	271.1/143.1	271.1/145.1
EE2	295.2/143.0	295.2/145.0

说明: \* 用于定量; \* \* 用于定性

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱峰分离条件的考察

采用 1.4 节中的色谱条件同时检测 E1、E2、EE2 和 E1-d4 的混合溶液,得到色谱峰型如图 1 所示,E1、EE2、E1 的出峰时间分别为 17.376; 17.810; 18.272 min。色谱图中 3 种物质色谱峰得到了较好分离,表明该色谱条件可用于同时检测 3 种雌激素。内标物

质 E1-d4 与 E1 分子结构相同,出峰时间相同,故而色谱峰与 E1 重叠,可用 HPLC-MS-MS 仪器自带 Mass-Hunter Workstation 数据处理系统通过分子量的差异进行自动提取和分析。

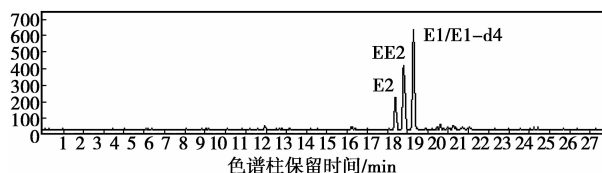


图 1 E1、E2、EE2 和 E1-d4 的分离色谱图

### 2.2 RSM 优化 HPLC-MS-MS 检测中的 MRM 条件

#### 2.2.1 单因素试验确定模型探测区域

在 MRM 实验中,碎片电压 (Fragment voltage) 对碎片离子具有聚焦选择作用;碰撞能 (Collision energy) 则对分子离子具有轰击作用,促使分子离子进一步裂解为碎片离子,以供串联质谱进行检测。二因素决定了 MRM 的高分辨率与高灵敏度,直接影响 MRM 的检测结果<sup>[23]</sup>。针对 E1、E2 和 EE2 3 种物质,分别做碎片电压和碰撞能的单因素试验,考察不同物质对应的碎片电压和碰撞能二操作参数的优化(单因素实验曲线图略),确定了响应曲面方法 (RSM) 模型探测区域:

E1 碎片电压  $F[170, 260]$ 、碰撞能  $C[30, 50]$ ; E2 碎片电压  $F[170, 270]$ 、碰撞能  $C[40, 60]$ ; EE2 碎片电压  $F[150, 250]$ 、碰撞能  $C[40, 60]$ ; E1-d4 碎片电压  $F[170, 260]$ 、碰撞能  $C[30, 50]$ 。

#### 2.2.2 基于响应曲面法 MRM 最佳操作条件的确定

##### 1) 优化实验的设计与回归方程式的选取

根据 2.2.1 所确定的模型探测区域,采用 Design-expert 7.1.3 软件设计实验混合矩阵,进行连续模型检验和失拟项检验。根据软件分析结果,3 种物质的模型检验结果均建议采用二次多项式模型,其  $p$  值 (概率  $> F$ ) 均小于 0.000 1,显示其他模型只有不大于 0.01% 的可能性比该模型能更好地适应响应。而失拟项检验结论与模型检验结果一致,进一步确定二次多项式模型更适合参数的特性响应。根据软件所设计实验混合矩阵检测结果,回归方程拟合如下

E1:

$$H = -80\,814.54 + 624.78 \times F + 1\,196.10 \times C - 0.69 \times F \times C - 1.45 \times F^2 - 12.17 \times C^2, \quad (1)$$

E2:

$$H = -78\,313.85 + 410.84 \times F + 2\,043.16 \times C +$$

$$0.03 \times F \times C - 1.05 \times F^2 - 20.08 \times C^2, \quad (2)$$

EE2:

$$H = -6\,506.75 + 39.31 \times F + 166.17 \times C + 0.03 \times F \times C - 0.11 \times F^2 - 1.61 \times C^2. \quad (3)$$

式中:  $H$  为色谱峰峰高;  $F$  为碎片电压;  $C$  为碰撞能。

有研究<sup>[24-25]</sup>指出模型应当用以下参数进行检验: 失拟项  $F$  值  $>0.1$ ; 模型拟合度  $R^2 >0.95$ ; 调整拟合度与预测拟合度之差 ( $\text{Adj } R^2 - \text{Pre}R^2$ )  $<0.2$ ; 相对偏差  $C.V. <10\%$ ; 精密性 (adequate precision)  $>4$ 。实验所得结果均满足以上各项指标 (表 2)。其中  $R^2$  均大于 0.95, 说明二次多项式模型均能解释 99.5% 以上响应值的变化, 具有较好的回归性, 可以用该模型对 3 种雌激素的串联质谱 MRM 检测过程进行分析和预测; 精密性衡量了信噪比的信号, 实验结果数据均大于 4, 说明该模型具有足够的信号来响应该设计。

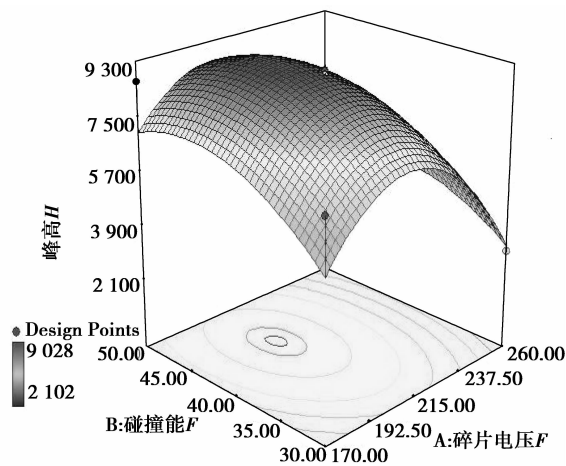
表 2 雌激素 RSM 模型响应指标

雌激素	失拟项 $F$	( $\text{Adj } R^2 - \text{Pre}R^2$ )
E1	70.42	$0.77 - 0.65 = 0.12$
E2	34.89	$0.95 - 0.78 = 0.17$
EE2	574.97	$0.96 - 0.83 = 0.13$

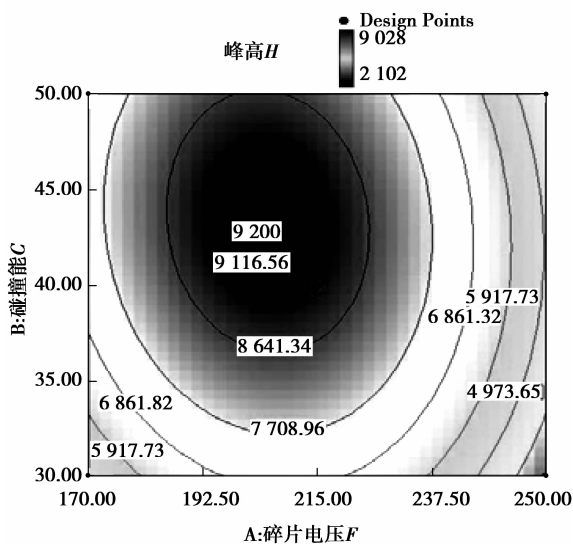
  

雌激素	C.V. / %	精密性	$R^2$
E1	9.80	8.32	0.97
E2	7.05	20.04	0.98
EE2	5.35	20.04	0.98

根据回归方程所作响应曲面图和等高线图如图 2-4 所示 (E1-d4 省略)。每张等高线图中均含有一个中心点, 这表明在实验设计时所选的因素水平合理。各因素及其交互作用对响应值的影响结果也可通过响应曲面图和等高线图直观反映出来, 图中等高线的形状反映出交互效应的强弱大小, 圆形表示两因素交互作用不显著, 而椭圆形则与之相反。由图可见, 在选定区域内, 色谱峰值均随着碎片电压  $F$  的增大先增高后减小 (碰撞能  $C$  相同), 这与单因素试验结论一致。但是相对而言, 碎片电压对色谱峰峰高  $H$  的检测值影响较大, 二者交互作用明显, 在 3 张图中可以明显看到 E1、E2 和 EE2 各自存在一个最高峰值区域 (深色区域)。

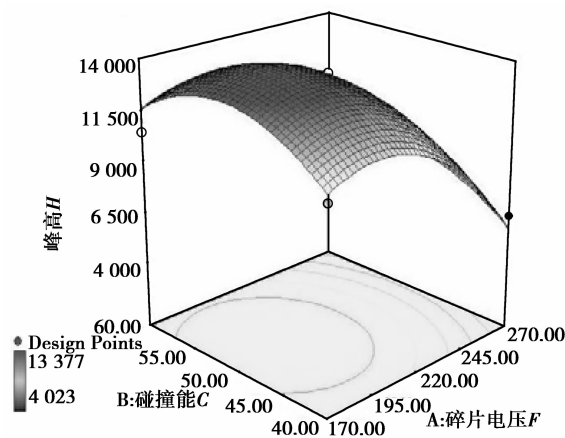


(a) 曲面图



(b) 等高线图

图 2 E1 的 HPLC-MS-MS 内标检测法中峰高  $H = f(F, C)$  双因子交互效应分析响应曲面图与等高线图



(a) 曲面图

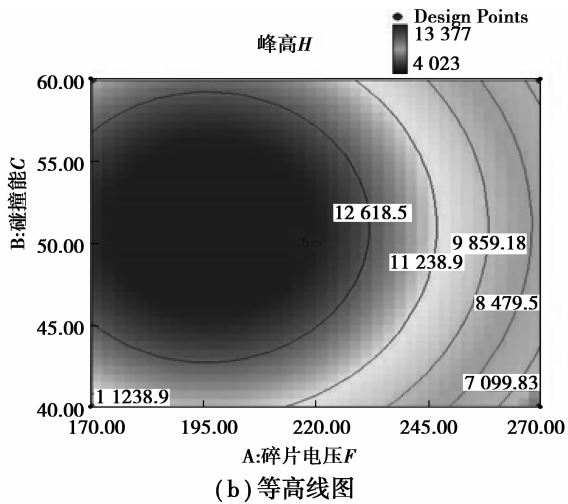


图 3 E2 的 HPLC-MS-MS 内标检测法中峰高  $H=f(F,C)$  双因子交互效应分析响应曲面图与等高线图

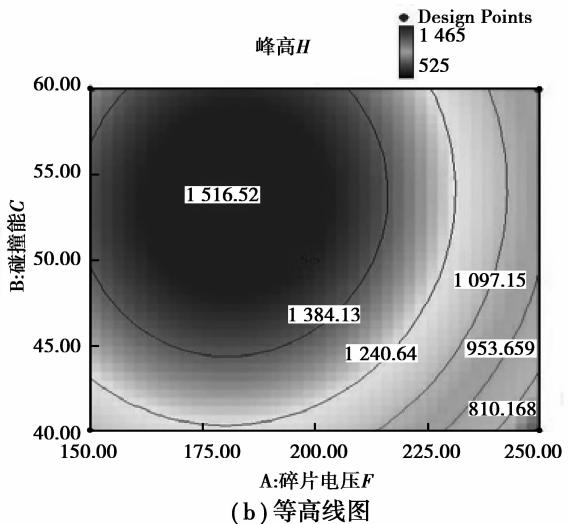
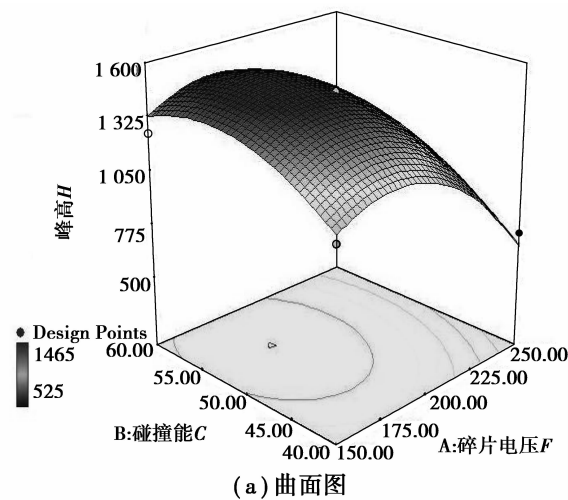


图 4 EE2 的 HPLC-MS-MS 内标检测法中峰高  $H=f(F,C)$  双因子交互效应分析响应曲面图与等高线图

C 的最佳操作条件如表 3 所示。

表 3 雌激素 MRM 最优操作条件

化合物	碎片电压/V	碰撞能/V
E1	205.0	43.0
E2	196.0	51.0
EE2	182.0	54.0
E1-d4	205.0	43.0

为了验证预测值,用以上得到的最优实验条件重复实验 3 次,模型预测值与实验值的最大误差不超过 3%,与预测值有较好的拟合性,证明了响应曲面法优化雌激素 MRM 检测条件的可行性。

### 2.3 雌激素 HPLC-MS-MS 实验条件的确定和应用

采用 2.1 的色谱条件和 2.2 所确定的最佳质谱 MRM 实验条件,对 E1、E2、EE2 分别进行 HPLC-MS-MS 内标实验条件中线性关系、精密度、重复性、回收率、检测限的测定,每个实验均分别检测 6 次并计算平均值。采用 1.2.2 中配置标准工作溶液进行检测,以雌激素与内标峰面积之比为纵坐标,雌激素浓度 (ng/mL) 为横坐标绘制标准曲线,得到 E1、E2 和 EE2 的线性回归方程分别为

$$E1: y = 1.82x + 0.40, R^2 = 0.9971, \quad (4)$$

$$E2: y = 0.10x + 0.01, R^2 = 0.9976, \quad (5)$$

$$EE2: y = 0.29x + 0.07, R^2 = 0.9979. \quad (6)$$

结果表明雌激素 E1、E2 和 EE2 分别在 0.5~100.1 ng/mL, 0.4~98.3 ng/mL, 0.1~99.4 ng/mL 范围内线性关系良好。

精密实验中, E1、E2、EE2 与内标物峰面积比值的 RSD 分别为 0.3%, 0.2%, 0.2% ( $n=6$ ); 重复性实验中,三者与内标物峰面积比值的 RSD 分别为 0.9%, 0.8%, 0.6% ( $n=6$ ); 实际水样加标回收实验结果见表 4。实验结果表明,在最优化检测条件下,检测结果的精密度、重复性、回收率均良好,可用于雌激素的样品检测。

进样量为 20  $\mu$ L 时,噪音平均值为 3.2 mAu, E1、E2 和 EE2 的检测限分别为  $LOD_{E1} = 0.5$  ng/L;  $LOD_{E2} = 0.4$  ng/L;  $LOD_{EE2} = 0.1$  ng/L。该值由 E1、E2 和 EE2 的仪器检测限 0.5、0.4、0.1 ng/mL 与浓缩倍数 1000 确定。

根据以上最优检测条件,对实际样品在预处理后进行了 HPLC-MS-MS 检测,结果如图 5-7 和表 4 所示。

嘉陵江磁器口段所取水样中检测出了 E1 (6.3 ng/L) 和 EE2 (0.4 ng/L), 而 E2 则低于检测限。与报道的国内其他城市水体检测数据相比,该取样点水样雌激素浓度远低于松花江哈尔滨段的

#### 2) 最佳实验条件确定与验证

对拟合方程(1)–(3)分别求偏导数,可得 E1、E2 和 EE2 的 MRM 检测条件中碎片电压  $F$  与碰撞能

E1(28.0~65.0 ng/L)、E2(15.0~29.0 ng/L)和EE2(9.0~11.0 ng/L)浓度<sup>[18]</sup>,与珠江广州河段的E1(2.5~8.2 ng/L)浓度接近<sup>[19]</sup>,但高于英国Severn Trent河(E1:未检出-7.1 ng/L、E2:未检出-2.5 ng/L和EE2未检出)和意大利Tiber河(E1:1.5 ng/L、E2:0.22 ng/L、EE2:0.11 ng/L)等多个检测河段水样的雌激素浓度<sup>[2,6]</sup>,这表明嘉陵江重庆主城河段存在雌激素内分泌干扰物污染风险。

某活性污泥法工艺污水厂的进出水中均检测出了3种雌激素,去除效率分别为E1:86.5%、E2:96.1%和EE2:71.9%,与英国环保署示范项目涉及的Ilkeston污水处理厂数据相似<sup>[2,6]</sup>。若按照英国环保署拟定的雌激素总当量浓度计算方式:

$[\sum 3ES] = [E1]/3 + [E2] + 10[EE2]$ <sup>[2]</sup>,则该水厂本组出水样的雌激素E2当量浓度为14.4 ng/L,

高于该署拟颁布的1.0 ng/L排放标准<sup>[1]</sup>,因而出水存在较高的雌激素污染风险。三峡库区重庆段城镇密度大,库区污水排放口和给水取水口呈交错布置,由于库区水体水文特性渐次由河流型向湖泊-河流型转变,水体自净能力有所减弱,且给水处理厂仍采用常规处理工艺,因此存在较大的雌激素内分泌干

扰物污染风险,对生态环境和居民健康构成了一定的威胁。

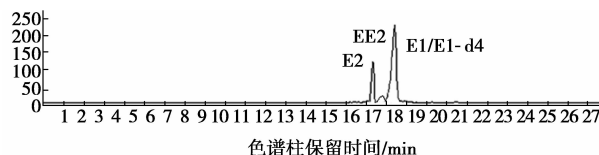


图5 污水厂进水水样 HPLC-MS-MS 内标检测色谱图

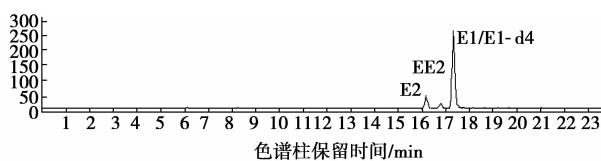


图6 污水厂出水水样 HPLC-MS-MS 内标检测色谱图

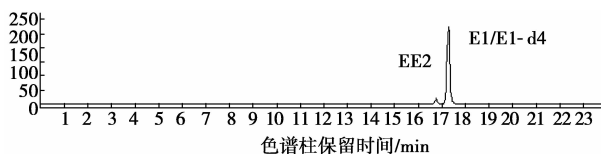


图7 河水水样 HPLC-MS-MS 内标检测色谱图

表4 水样分析结果

水样	E1 分析结果				E2 分析结果				EE2 分析结果			
	加标浓度 (ng·L <sup>-1</sup> )	检测浓度 (ng·L <sup>-1</sup> )	相对标准 偏差/%	加标 回收 率/%	加标浓度 (ng·L <sup>-1</sup> )	检测浓度 (ng·L <sup>-1</sup> )	相对标准 偏差/%	加标 回收 率/%	加标浓度 (ng·L <sup>-1</sup> )	检测浓度 (ng·L <sup>-1</sup> )	相对标准 偏差/%	加标 回收 率/%
进	0.0	70.9±5.8	8.1	98.0	0.0	56.47±3.2	5.6	96.6	0.0	3.2±0.2	6.3	95.0
水	30.0	99.3±6.6	6.6		30.0	85.44±3.6	4.3		2.0	5.1±0.3	5.2	
出	0.0	9.6±0.7	7.3	102.0	0.0	2.2±0.1	5.8	95.0	0.0	0.9±0.1	8.9	97.5
水	5.0	15.0±0.5	3.6		2.0	4.1±0.2	5.7		2.0	2.85±0.1	4.6	
河	0.0	6.3±0.2	3.2	96.7	0.0	<0.4	95~	95~	0.0	0.4±0.0	3.3	89.5
水	3.0	9.2±0.2	2.0		2.0	1.93±0.0	0.0		100	2.0	2.19±0.1	

### 3 结 语

1)采用RSM对E1、E2和EE2 3种雌激素以及内标物质E1-d4的MRM检测条件进行了曲面优化,得到E1、E2、EE2和E1-d4的最优碎片电压分别为205.0、196.0、182.0、205.0 V;最优碰撞能分别为43.0、51.0、54.0、43.0 V。

2)根据优化后的MRM条件对3种雌激素进行HPLC-MS-MS内标法检测,配合SPE样品预处理,可有效地检测出环境浓度低于1.0 ng/L的雌激素,其检测限分别为0.5、0.4、0.1 ng/L,灵敏度、精确度、准确度和重复性均较好。

3)嘉陵江重庆主城段(磁器口水域)存在雌激素

污染风险,某活性污泥法污水厂出水雌激素浓度高于1.0 ng/L的暂定英国标准,对长江的水生生态环境构成一定风险。

#### 参考文献:

- [1] BUTWELL A J, GARDNER M J, GORDON-WALKER S J, et al. Scoping Study for a National Demonstration Programme on EDC Removal[M]. UK: UKWIR, 2005.
- [2] 阳春,胡碧波,张智. 类固醇雌激素在生活污水处理中的去除过程[J]. 中国给水排水, 2008, 10(24): 11-15. YANG CHUN, HU BI-BO, ZHANG ZHI. Removal of steroid oestrogens during sewage treatment[J]. China Water & Wastewater, 2008, 10(24): 11-15.
- [3] MATTHIESSEN P, AMOLD D, JOHSON A C, et al.

- Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms [J]. *The Science of the Total Environment*, 2006, 367 (2/3): 616-630.
- [4] SCHLENK D. Are steroids really the cause for fish feminization? A mini-review of in vitro and in vivo guided TIEs [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2008, 1(8):1-5.
- [5] SUZUKI Y, MARUYAMA T. Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge [J]. *Water Research*, 2006, 40(5): 1061- 1069.
- [6] YANG C. Removal of steroid oestrogens in wastewater treatment[D]. UK: Department of Civil and Building Engineering Loughborough University, 2007.
- [7] LINDBERG R H, WENNERBERG P, JOHANSSON M I, et al. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden [J]. *Environmental Chemistry*, 2005, 39(10): 3421-3429.
- [8] GOMES R L, BIRKETT J W, SCRIMSHAW M D, et al. Simultaneous determination of natural and synthetic steroid estrogens and their conjugates in aqueous matrices by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, 85(1): 1-14.
- [9] LABADIE P, BUDZINSKI H. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381(6): 1199-1205.
- [10] BRAGAL O, SMYTHE GA, SCHAFFER AI, et al. Steroid estrogens in ocean sediments [J]. *Chemosphere*, 2005, 61(6): 827-833.
- [11] 刘红梅, 李可意. 均匀设计-响应曲面法优化莪术的超临界 CO<sub>2</sub> 萃取工艺[J]. *中草药*, 2007, 38(4): 535-538. LIU HONG-MEI, LI KE-YI. Optimizing supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Curcuma phaeocaulis* with uniform design and response surface methodology[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2007, 38(4):535-538.
- [12] 徐颖, 李明利, 赵选民. 响应曲面回归分析法——一种新的回归分析法在材料研究中的应用[J]. *稀有金属材料与工程*, 2001, 30(6): 428-432. XU YING, LI MING-LI, ZHAO XUAN-MIN. The response curved surface regression analysis technique—the application of a new regression analysis technique in materials research [J]. *Rare Metal Materials and Engineering*, 2001, 30(6): 428-432.
- [13] BALA K, KAUSHIK A, KAUSHIK C P. Response surface methodological approach for optimizing removal of Cr(VI) from aqueous solution using immobilized cyanobacterium [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2007, 126(2/3):147-153.
- [14] AMIMI M, YOUNESI H, BAHRAMIFAR N. Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*[J]. *Hazard. Mater.*, 2008,154:694-702.
- [15] LU W, KAO W, SHI J. Exploring multi-metal biosorption by indigenous metal-hyperresistant *Enterobacter* sp. J1 using experimental design methodologies[J]. *Hazard. Mater.*, 2008,153:372-381.
- [16] CHEN J, LUO J, QIU Z, et al. PCDDs/PCDFs and PCBs in water samples from the Three Gorge Reservoir [J]. *Chemosphere*, 2008, 70: 1545-1551.
- [17] WANG J, BI Y, PFISTER G, et al. Determination of PAH, PCB, and OCP in water from the Three Gorges Reservoir accumulated by semipermeable membrane devices (SPMD)[J]. *Chemosphere*, 2009, 75: 1119-1127.
- [18] 邵晓玲, 马军. 松花江水 13 种内分泌干扰物的初步调查[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(9):1910-1915. SHAO XIAO-LING, MA JUN. Preliminary investigation on 13 endocrine disrupting chemicals in the Songhua River[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(9): 1910- 1915.
- [19] 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*, 2008, 27(2): 242-244. GONG JIAN, RAN YONG, YANG YU, et al. Contamination of estrogenic compounds in the surface water of Guanzhou reach of the pearl river [J]. *Environmental Chemistry*, 2008, 27(2):242-244.
- [20] ANGELA Y C L, YU T, SHAIK KL, et al. Removal of pharmaceuticals in secondary wastewater treatment processes in Taiwan [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 108(1):1-27.
- [21] 阳春, 胡碧波, 郑怀礼, 等. 雌酮、雌二醇与乙炔基雌二醇在污水样中的稳定性研究[J]. *化学研究与应用*, 2008, 20(8):967-971. YANG CHUN, HU BI-BO, ZHENG HUAI-LI, et al. Stability tests of oestrone, 17 $\beta$ -oestradiol and 17 $\alpha$ -ethynyl oestradiol in sewage samples [J]. *Chemical Research and Application*, 2008, 20(8): 967-971.
- [22] BRAGA O, SMYTHE G A, SCHAFFER A I. Steroid estrogens in ocean sediments[J]. *Chemosphere*, 2004, 61(6): 827-833.
- [23] FELINGER A. *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*[M]. Holland: Elsevier, 2007.
- [24] MYERS R H, MONTOMERY D C, GEOFFREY V G, et al. Response surface methodology: a retrospective and literature survey [J]. *Journal of Quality Technology*, 2004, 36(1): 53-78.
- [25] MYERS H R, MONTGOMERY D C, ANDERSON-COOK C M. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*[M]. USA: John Wiley and Sons, 2009.
- [26] 阳春, 胡碧波, Wheatley Andrew. 污水处理中雌酮的定量分析[J]. *重庆大学学报*, 2009, 32(6): 716-720. YANG C, HU B, WHEATLEY A. Quantification of estrone in sewage treatment by an enzyme-linked immunosorbent assay kit [J]. *Journal of Chongqing University*, 2009, 32(6):716-720.