

广东四会邓村河水体中雌/雄激素物质的含量及分布

侯丽萍^{1,2}, 刘 珊¹, 方展强³, 应光国^{1*}

(1.中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640; 2.广州大学华南生物多样性保护与利用重点实验室, 广州 510006; 3.华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631)

摘要:对受造纸废水污染的广东四会邓村河水体中存在的类雌/雄激素物质的数量和种类进行监测, 以确定造成生活在邓村河水域的食蚊鱼发生性逆转的目标化合物。采用 LC-MS/MS 方法, 于 2011 年夏季对邓村河设置包括对照点在内的 4 个检测点, 对水体中的 5 种雌激素物质和 10 种雄激素物质的含量作了定量检测。结果显示, 雌激素物质中雌二醇(17 α -estradiol, E₂)、雌三醇(estriol, E₃)、炔雌醇(17B-ethinylestradiol, EE₂)和己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)在各检测点均未检出, 仅检出雌酮(estrone, E₁) 1.97~5.09 ng·L⁻¹; 雄激素类物质中 1,4 雄烯二酮(androstadienedione, ADD)、17 α -勃酮(17 α -boldenone)、17 β -勃酮(17 β -boldenone)、雄烯二酮(androstenedione, AED)、睾酮(testosterone)、炔诺孕酮(norgestrel)、反式雄酮(epi-androsterone)、雄酮(androsterone)、孕酮(progesterone)、羟甲雄烷吡唑(stanozolol)均有检出, 其含量分别为 13.47~30.46、1.50~3.69、1.50~3.69、1.89~6.77、0.89~1.43、1.97~2.57、6.29~18.93、3.58~12.05、1.42~2.86、0.69~0.70 ng·L⁻¹。各采样点被检出的雌/雄激素物质含量均高于对照点(REF)的含量, 其中 E₁ 在各个点都有检出, 最高含量为 5.29 ng·L⁻¹; 采样点 A 的 ADD、AED 和 Progesterone 含量最高, 分别为 30.46、6.77、2.86 ng·L⁻¹。结果表明, 邓村河水主要被 E₁、ADD、AED 和 Progesterone 污染, 在引起该水域生活的食蚊鱼雌/雄激素生物效应中起到重要作用。

关键词:雌/雄激素物质; 定量分析; 邓村河; 四会市

中图分类号: X832 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)01-0135-06 doi:10.11654/jaes.2013.01.020

Concentrations and Distribution of Estrogenic and Androgenic Chemicals in Water Collected from Dengcun River, Sihui City, Guangdong Province

HOU Li-ping^{1,2}, LIU Shan¹, FANG Zhan-qiang³, YING Guang-guo^{1*}

(1.State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China; 2.Key Laboratory of Conservation and Application in Biodiversity, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; 3.Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: This paper monitored the content of estrogen and androgen in the polluted water samples from Dengcun River and intended to determine the target compound which caused the sex reversal of mosquitofish. The LC-MS/MS method was introduced along with the setting of four test points and one control point by Dengcun River in summer 2011. Five types of Estrogenic and ten types of Androgenic in each water samples were detected quantitatively by this method. The results showed that only the estrone(E₁) was detected in estrogenic hormone, and the range of E₁ was 1.97~5.29 ng·L⁻¹. Androgenic hormone androstadienedione (ADD), 17 α -boldenone, 17 β -boldenone, androstenedione (AED), testosterone, norgestrel, epi-androsterone, androsterone, progesterone and stanozolol were detected, the range of content were 13.47~30.46, 1.50~3.69, 1.50~3.69, 1.89~6.77, 0.89~1.43, 1.97~2.57, 6.29~18.93, 3.58~12.05, 1.42~2.86 and 0.69~0.70 ng·L⁻¹, respectively. The content of Estrogen and Androgen was found to be higher in each sampling points than that in the control point (REF). E₁ was detected in all test points and has a highest level of 5.29 ng·L⁻¹. Sampling point A had the highest ADD, AED and progesterone content up to 30.46, 6.77 and 2.86 ng·L⁻¹, respectively. The results indicated Dengcun River was mainly polluted by E₁, ADD ADE and Progesterone, which caused the biological effect of sex reversal of mosquitofish.

Keywords: estrogenic and androgenic chemicals; quantitative analysis; Dengcun River; Sihui City

收稿日期: 2012-05-03

基金项目: 国家自然科学基金(20977092); 广东省教育厅育苗工程项目(2012LYM_0100); 广州大学新苗计划

作者简介: 侯丽萍(1977—), 女, 广东韶关人, 博士, 讲师, 主要研究方向: 水生动物生态与环境监控。E-mail: Houliping7710@163.com

* 通信作者: 应光国 E-mail: guang-guo.ying@gig.ac.cn

广东省四会市邓村是四会城区西南 13 km 的一个半山区半丘陵小镇,人口 12 300 多人。目前,邓村年产会纸制品 1500 多吨,出口约 1000 多吨,纸作坊 700 多间,纸品厂 1100 多间,从业人员 5000 多人,年产值 7000 多万元。自南宋以来,中原人民南迁邓村,带来造纸技术,利用盛产竹子、水源丰富等有利条件,建起了灰池、作坊、晒场,开始从事竹纸生产,延续至今 800 余年,是全国最原始,从业人数最多的民间古法造纸著名古村落。目前共有 7 家民间造纸作坊座落在邓村河流沿岸,这些造纸作坊每天排出造纸废水注入邓村河。造纸废水来源于碎竹、洗浆和煮浆过程中的用水,不经任何处理直接排入邓村河中,每天的排放量约为 40 m³,在枯水期,废水量可达邓村河容量的一半。作者前期的野外调查工作显示,邓村造纸废水采样点出现了雌性食蚊鱼雄性化的现象,表明该水域已经受到雌/雄激素类物质的污染^[1]。确定引起食蚊鱼内分泌干扰效应的化合物以及探讨这些化合物导致食蚊鱼发生性逆转的作用机制将是一个具有重要科学意义的研究项目。本文探讨利用 LC-MS/MS 对水样中的可疑雌/雄激素类化合物进行定量检测,确定引起邓村河中食蚊鱼发生内分泌干扰效应的目标化合物,同时解析与寻踪邓村造纸废水类雌/雄激素物质的污染源,研究成果将为当地政府和环保部门对水环境保护和治理提供有价值的参考资料。

1 材料与方法

1.1 药品试剂和器材用具

所有标样分别购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH (德国)、Supelco (美国)、Riedel-de Han (德国)、Sigma-Aldrich (美国) 和 Cambridge Isotope Laboratories Incorporation (美国),纯度>97%。过滤水样的滤膜为 Whatman GF/F (直径 47 mm,孔径 0.7 μm),使用前于马弗炉中经 400 °C 烘烤 4 h; 过滤浓缩后样品的滤膜均为有机相微孔滤膜(直径 13 mm,孔径 0.22 μm); 固相萃取柱为 Waters Oasis HLB 柱 (6 mL, 500 mg 吸附剂)。

净化装置和材料:层析柱(自制)规格分别为内径 0.8 mm、长度 180 mm;硅胶(100–200 目)(AR,青岛海洋一厂),用甲醇抽提 24 h 后用二氯甲烷抽提 24 h,通风橱干燥后置于烘箱中于 160 °C 下活化 24 h,保存于干燥器中备用;玻璃棉(CNW 公司,加拿大);无水硫酸钠(国产),使用前置马弗炉(400 °C)中烘烤 4 h,备用;氮吹仪和 16 通道固相萃取仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 标样配制

标样均配成浓度为 100 mg·L⁻¹ 的单标储液,溶于甲醇(色谱纯)中,储液保存于 125 mL 的棕色试剂瓶中,置-18 °C 冰箱保存备用,所需的低浓度标样和内标均从储液中以小于 10 倍梯度逐步稀释。

1.2.2 水样采集

采样点:根据邓村河现状,本研究选取了 REF、A、B、C 等 4 个采样点,A、B、C 采样点分别位于邓村造纸作坊的下游,对照点(REF)为不受造纸废水污染的地点,邓村河与对照点河流最终汇入绥江。采样地点如图 1 所示。

同一采样点以棕色玻璃瓶采集各 1 L 水样(3 次平行),取同一断面水平面 0.5 m 以下左、中、右 3 个点的混合样。水样立即加入 50 mL 甲醇(色谱纯)和 400 μL 4 mol·L⁻¹ H₂SO₄,置于 4 °C 冰盒中运回实验室,并于 48 h 内进行前处理。使用水质参数仪测定各采样点的水质参数,如 pH 值、温度、硬度和 DO 值^[1]。

1.2.3 水样固相萃取

取 3 瓶(平行取样)1 L 水样,过 GF/F 滤膜。HLB 固相萃取柱分别加入 10 mL 甲醇和 10 mL Milli-Q 活化,10~15 mL·min⁻¹ 过 HLB 柱;加入 2×50 mL 5% 的甲醇水溶液润洗采样瓶,并将润洗溶液过 HLB 柱。擦干固相萃取装置内的水分,以锡纸轻轻覆盖 HLB 柱,抽干 2 h;以 4 mL 和 3 mL 甲醇(色谱纯)先后洗脱 HLB 柱,再以 3 mL 和 2 mL 二氯甲烷(色谱纯)先后洗脱 HLB 柱;合并洗脱液于 N₂ 下轻轻吹干,以 1 mL 甲醇(色谱纯)重新定容,过 0.22 μm 有机相滤膜,转移至 2 mL 的棕色小瓶中,于-18 °C 保存。

1.2.4 水样固相萃取产物净化

为尽量减少仪器分析过程其他非目标化合物的干扰,固相萃取液加做净化程序必不可少^[2-3]。本实验净化方法参照文献[4]方法稍做改动,包括装柱、加标样、活化净化柱、溶解样品和定容等步骤。目标化合物(激素)分析也参照文献[4]的方法,采用快速液相串联质谱进行分析(RRLC-MS/MS)。数据收集和处理采用 Agilent MassHunter 软件(v 1.0),目标化合物的定量分析采用 MRM 模式。

1.2.5 质量控制

雄激素的标准曲线浓度设置为 1.0~1000 μg·L⁻¹;雌激素的标准曲线浓度为 1.0~200 μg·L⁻¹,分析结果表明线性极好,所有标准曲线相关系数都大于 0.99。

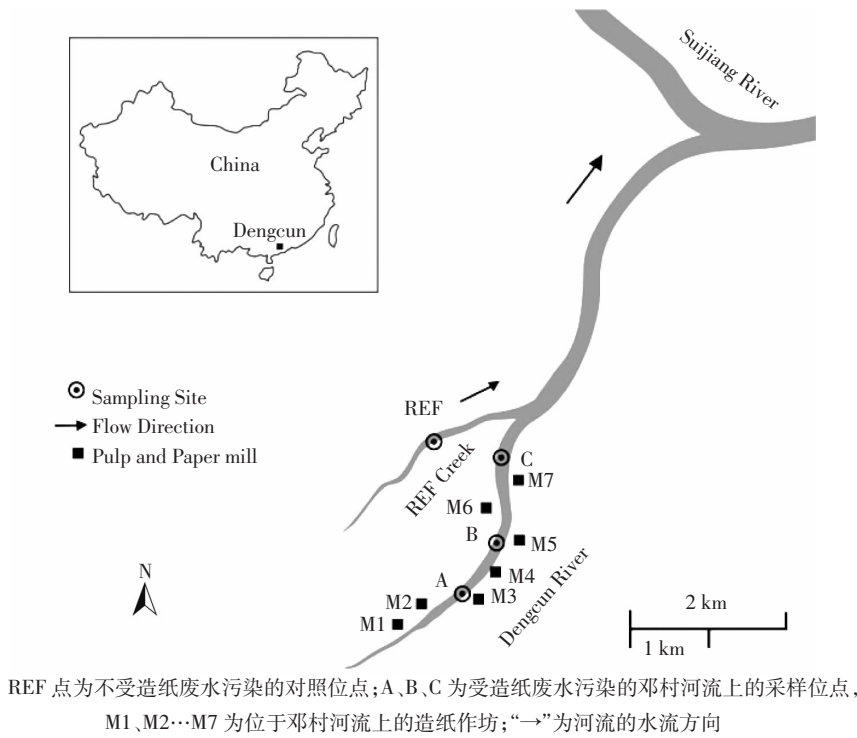


图 1 邓村河采样点^[1]

Figure 1 Map showing the location of the sampling sites on the Dengcun River, Sihui, South China

此外,本实验固相萃取和仪器分析方法结果回收率较好,证明该实验分析方法得出数据可靠^[4]。

2 结果与分析

2.1 各采样点的水质参数

REF 位于未受造纸废水污染的河流,A、B、C 采样点位于受造纸废水污染的邓村河。从表 1 的数据可以看出,各采样点的水温差别都不大,A、B、C 点水的电导率比 REF 点的高,而溶氧量则比 REF 点的低。说明河水中有机质比较丰富导致溶解氧降低,但是金属离子和酸根离子的含量则相对比较高,河水的电导率较大。4 个采样点的 pH 值差别不大。

2.2 雌激素类物质含量

本研究中检测了雌酮(estrone, E₁)、雌二醇(17α-

estradiol, E₂)、雌三醇(estriol, E₃)、炔雌醇(17β-ethinylestradiol, EE₂)和己烯雌酚(diethylstilbestrol, DES)等 5 种雌激素。邓村河流 3 个采样点和对照点的水样化合物数据分析结果显示:几类雌激素中除 E₁ 在各个点均有检出外,E₂、E₃、EE₂ 和 DES 都未检出。E₁ 的含量在对照位点 REF 检出的浓度最低为 1.80 ng·L⁻¹,A 点检出值最高,达到 5.29 ng·L⁻¹,B 采样点为 1.97 ng·L⁻¹,C 采样点为 2.09 ng·L⁻¹。

2.3 雄激素类物质含量

10 种雄激素或疑似有雄激素效应的物质在各采样位点的检测结果如表 2 所示。其中 1,4 雄烯二酮(androstadienedione, ADD),雄烯二酮(androstenedione, AED),炔诺孕酮(norgestrel),睾酮(testosterone),反式雄酮(Epi-androsterone),孕酮(progesterone)

表 1 采样点水质的理化指标^[1]

Table 1 Water quality parameters of the Dengcun River and reference river population survey sites

采样点 Sampling point	对照点 REF	A	B	C
位置 Location/GPS	N23°32'75" E112°58'05"	N23°31'10" E112°58'23"	N23°31'57" E112°58'60"	N23°32'46" E112°58'68"
水温 Water temperature/℃	24.5±0.1	24.3±0.2	24.1±0.3	24.2±0.2
电导率 Conductivity/μS·cm ⁻¹	114.6±2.7	163.8±0.1	150.9±0.1	156.5±0.1
pH	7.9±0.2	7.6±0.1	7.8±0.1	7.5±0.1
溶解氧 Dissolved oxygen/mg·L ⁻¹	1.8±0.1	1.1±0.3	1.4±0.2	1.3±0.1

注:本表中数据用“平均数±标准差”的形式表示。下同。
Notes: Data in this table is expressed as mean±SD. The same below.

terone), 17 α -勃酮(17 α -boldenone), 17 β -勃酮(17 β -boldenone), 雄酮(androsterone), 羟甲雄烷吡唑(stanozolol)这10种化合物在所有采样点中均有检出。在各个采样点检出浓度较高的化合物包括 ADD, AED, Epi-androsterone 和 Androsterone, 其中, ADD 的含量最高, 在 A 点达到 30.46 ng·L⁻¹, 其次是 Androsterone, 为 12.05 ng·L⁻¹。

3 讨论

3.1 雌激素

本研究中 E₂、E₃、EE₂ 和 DES 均没有检出, 但 E₁ 在各点都有检出。E₂、E₃ 和 DES 为天然雌激素, 是由卵巢分泌的一类有广泛生物活性的类固醇化合物, 它不仅有促进和维持女性或雌性动物生殖器官和第二性征的生理作用, 并对内分泌系统、心血管系统、肌体的代谢、骨骼的生长和成熟等方面均有明显的影响。人和动物体内每天都会合成 E₂, 并且稳定在一个正常的水平, 在动物的不同生长发育时期波动较大。体内合成的 E₂ 有一部分随着动物的排泄废物排出体外而进入环境介质。雌酮(E₁)是雌二醇(E₂)的氧化产物, 其生物学作用弱于雌二醇, 而强于雌三醇(E₃)。化学分析的结果显示, 邓村造纸废水各采样点均含有 E₁, 且 A 点的含量最高。化学分析的结果与体外酵母实验的结果基本一致^[5], 但化学分析并未检测到 B 点和 C 点的 E₁ 浓度与对照点有明显的差异。可能这些位点还存在着其他雌激素使得体外酵母实验中显示出雌激素效应。已有学者^[6]发现瑞典一造纸厂出水同时具有雌激素和雄激素活性, 酵母雄激素受体实验表明雄激素浓度为 5.6 ng·L⁻¹ 等当量二氢睾酮, 暴露于其中的斑马鱼出现两性现象, 而且种群中雄性比例明显偏高, 这与以上的推测一致。

3.2 雄激素

本研究发现, 10 种雄激素或疑似有雄激素效应的物质 ADD (1,4 雄烯二酮)、AED (雄烯二酮)、Norgestrel (炔诺孕酮)、Testosterone (睾酮)、Epi-androsterone (反式雄酮)、Progesterone (孕酮)、17 α -boldenone (17 α -勃酮)、17 β -boldenone (17 β -勃酮)、Androsterone (雄酮)、Stanozolol (羟甲雄烷吡唑) 在各采样点中均有检出。与对照点相比, 造纸废水 ADD、AED 和 Progesterone 的含量较高, 造纸废水 A 采样点的 ADD、AED 和 Progesterone 含量最高, 分别为 30.46、6.77、2.86 ng·L⁻¹。结果显示, 邓村造纸废水河流受雄激素污染严重, 以 A 采样点的雄激素浓度最高, 污染最为严重, 与体外酵母实验显示的结果较为一致^[5]。Jenkins 等^[7]使用 HPLC 法在发现有雄性化的雌性食蚊鱼的 Fenholloway 河流中检测到 AED 的存在, 浓度为 0.14 nmol·L⁻¹, 但没有对其他化合物进行检测。他们认为引起雌性食蚊鱼雄性化的化合物可能是 AED。此后, 又在该河流重新检测到 AED 的浓度为 2.4 nmol·L⁻¹, 同时还检测到了孕酮的存在, 浓度为 155 nmol·L⁻¹^[8]。利用植物如松木作为原材料的造纸废水中含有大量的植物甾醇素, 如 β -sitosterol, Campesterol 和 Stigmastanol^[9]。也有学者提出, 细菌代谢植物甾醇素是导致造纸废水中雌性食蚊鱼雄性化的可能途径, 他们认为 Mycobacterium smegmatis 能转换 β -sitosterol 为 AED 和 ADD, 从而引起雌性食蚊鱼雄性化^[10-11]。而另有研究表明细菌如 Mycobacterium smegmatis 能将植物甾醇素转化为 AED 和 ADD^[12]。此外, 有研究发现 AED 还可直接来源于植物, 如松木的花粉中存在 AED^[13]。Durhan 等则认为 AED 不是致使造纸废水中雌性食蚊鱼形态雄性化的原因, 因为 AED 在雄激素受体结合试验中引起的雄激素效应比较弱,

表 2 邓村造纸废水水环境雄激素类物质的 LC-MS/MS 定量分析结果 (ng·L⁻¹)

Table 2 Concentrations of androgens in surface water samples in Dengcun River detected by RRLC-MS/MS (ng·L⁻¹)

雄激素物质 Androgens/ng·L ⁻¹	对照点 REF	A	B	C
1,4 雄烯二酮 Androstadienedione	1.40±0.11	30.46±0.45	13.98±0.31	13.47±0.62
17 α -勃酮 17 α -boldenone	1.22±0.27	3.69±0.67	1.53±0.25	1.50±0.41
17 β -勃酮 17 β -boldenone	1.22±0.23	3.69±0.62	1.53±0.37	1.50±0.15
雄烯二酮 Androstenedione	1.45±0.13	6.77±0.68	1.90±0.45	1.89±0.49
睾酮 Testosterone	0.75±0.05	1.43±0.53	0.91±0.53	0.89±0.23
炔诺孕酮 Norgestrel	1.86±0.31	2.57±0.26	1.97±0.56	2.24±0.31
反式雄酮 Epi-androsterone	3.24±0.24	18.93±3.98	9.12±0.63	6.29±0.36
雄酮 Androsterone	3.13±0.19	12.05±0.61	4.10±0.12	3.58±0.35
孕酮 Progesterone	0.98±0.81	2.86±0.23	2.13±0.24	1.42±0.62
羟甲雄烷吡唑 Stanozolol	0.69±0.33	0.70±0.38	0.69±0.46	0.69±0.49

用 AED 喂食雌性食蚊鱼,并未观察到出现雄性化转变的现象^[14]。但也有学者^[8]认为 Durhan 等的受体结合试验中使用的是人类的雄激素受体,这与鱼类的雄激素受体有一定差别,因而与雌性食蚊鱼雄性化的效应不一致。除了松树外,其他的植物也存在可转化为 AED 的植物甾醇素,如在用蔗糖为原料进行造纸的河流下游发现了雄性化的雌性食蚊鱼^[15]。邓村造纸所用的原料是竹子,推测在制浆造纸过程中,释放出了植物甾醇素,而植物甾醇素进一步代谢为 AED、ADD 等雄激素物质,导致了生活在其中的雌性食蚊鱼雄性化。此外,John 等^[16]在 Fenholloway 河还检测到了大量的孕酮的存在,因此他们推测引起雌性食蚊鱼雄性化的化合物有可能是来源于自然界,孕酮大量存在于木材当中。而孕酮可以代谢为 AED 和 ADD,其途径如图 2 所示。本研究中检测到的孕酮的含量也比较高,表明造纸废水致食蚊鱼雄性化的途径很可能如一些学者^[16]所推测的途径。

雄烯二酮(AED)是由孕酮经雄酮生物合成睾酮过程中的中间物,其生物活性较睾酮弱,在环境中很容易转化为 1,4 雄烯二酮(ADD),可以作为解释 ADD 含量为什么比 AED 高的原因。造纸废水中的化合物还可能通过诱导 EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) 酶活性的途径来使得雌性食蚊鱼发生雄性化转化。EROD 加快了雄激素合成的速度,同时抑制雄激素转化为雌激素的速度^[18-19]。大量研究表明,暴露于造纸废水中的食蚊鱼的 EROD 活性被诱导,性腺的生长受抑制,激素水平受干扰,第二性征发生改变^[20]。本研究发现,除了以上 3 种化合物,与对照点相比,Epi-androsterone 的含量也较高,达到 $18.93 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Epi-androsterone 为反式雄酮,是雄酮 Androsterone (即 3α -羟-5 α -雄烷-17-酮)的代谢物,以上两种化合物可以相互转化,均是男性尿中检出的睾酮代谢物。邓村河流位于居民生活区附近,居民生活废水的排放可能是该地雄酮和反式雄酮含量高的主要原因之一。至于为何造纸废水暴露位点 Epi-androsterone 的含量较高,仍需进一步研究。

目前,对雄激素污染的研究尚处于起步阶段。赵建亮等^[21]对珠江流域的河流进行检测时发现,石井河的部分采样点的地表水中在枯水期和丰水期都检测到雄激素活性的存在,最高浓度为 $(32.5 \pm 18.3) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ DEQ(DHT equivalents)。而在石井河沉积物中却没有检测到任何雄激素活性的存在。对英国 Thames River 河口的地表水采用 YES 检测表明,27%的地表水样品具有雄激素活性,最大达到 $9 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ DEQ,采用毒性鉴定(TIE)方法确定 99%的雄激素活性来自于 DHT(双氢睾酮)、Androstenedione(雄烯二酮)和 Androsterone(雄酮)等几种雄激素物质^[22]。利用生物法在污水厂出水 and 受纳河流中同时检出雌激素和雄激素,并指出雌酮的存在强化了雄激素的活性,雌激素和雄激素的相互作用增强了对生物的内分泌干扰作用^[23]。已有研究^[24]证实,同一类内分泌干扰物之间(雄激素之间或雌激素之间)能强化联合作用,但对于雌、雄激素间的相互作用机制还不清楚。很多研究表明,雌激素的危害中包括诱发卵黄蛋白原,抑制雄性激素的分泌,而雄激素则抑制雌激素的产生以及减少卵黄蛋白原,从此角度看雌、雄激素作用相反,其生物效应可以相互抵减。然而,对实际环境样点研究发现,在很多受到内分泌干扰物污染的水体中,同时出现雄鱼雌性化和雌鱼雄性化现象^[6,25-26]。因此,复杂环境介质中环境内分泌干扰物对生物的联合效应这方面的研究还需要加强。另外,还要注重低剂量的雄激素在复杂环境中对生物影响的研究,以期准确反映可能造成的生态风险。

4 结论

本研究中雌激素 E_2 、 E_3 、 EE_2 和 DES 在各检测点均未检出,但 E_1 在各点都有检出。10 种雄激素或疑似有雄激素效应的物质 ADD、AED、Norgestrel、Testosterone、Epi-androsterone、Progesterone、 17α -boldenone、 17β -boldenone、Androsterone 和 Stanozolol 在各采样点中均有检出。与对照点相比,造纸废水中 ADD、AED 和 Progesterone 的含量较高,造纸废水 A 采样点的

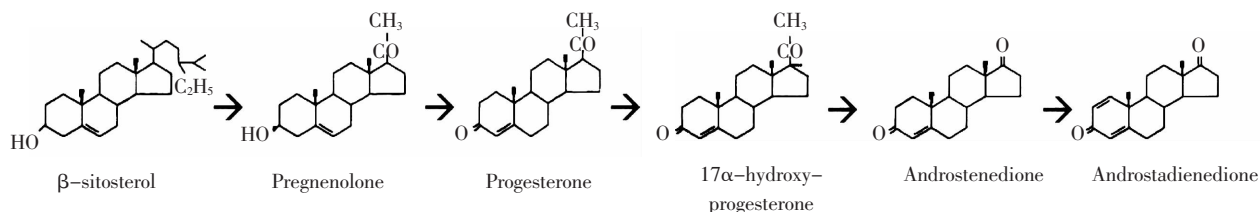


图 2 β -植物甾醇素和孕酮在鱼类体内可能的代谢途径^[17]

Figure 2 Proposed pathway for bioconversion of β -sitosterol and progesterone to androgens in paper mill effluent

ADD、AED和 Progesterone 含量最高, 分别为 30.46、6.77、2.86 ng·L⁻¹。

参考文献:

- [1] HOU L P, XIE Y P, YING G G, et al. Developmental and reproductive characteristics of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to paper mill effluent in the Dengcun River, Sihui, South China[J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 103(3-4): 140-149.
- [2] 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.
- [3] CHEN F, YING G G, YANG J F, et al. Rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of endocrine disrupting chemicals (EDCs), pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater irrigated soils[J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 2010, 45: 682-693.
- [4] LIU S, YING G G, ZHAO J L, et al. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218: 1367-1378.
- [5] 侯丽萍. 造纸废水致食蚊鱼内分泌干扰及生态毒理效应的研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2011.
Hou L P. Endocrine disruption effects and ecotoxicological effects in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) exposed to paper mill effluent [D]. Guangzhou: South China Normal University, 2011.
- [6] ORN S, SVENSON A, VIKTOR T, et al. Male-biased sex ratios and vitellogenin induction in Zebrafish exposed to effluent Water from a Swedish pulp mill. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51: 445-451.
- [7] Jenkins R, Angus R A, McNatt H, et al. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2001, 20: 1325-1331.
- [8] Jenkins R L, Wilson E M, Aagus R M, et al. Androstenedione and progesterone in the sediment of a river receiving paper mill effluent[J]. *Toxicological Sciences*, 2003, 73: 53-59.
- [9] Conner A H, Rowe J W. Neutrals in southern pine tall oil [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1975, 52: 334-338.
- [10] Denton T E, Howell W M, Allison J J, et al. Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1985, 35: 627-632.
- [11] Howell W M, Denton T E. Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis* masculinized by exposure to degradation products from plant sterols[J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1989, 32: 795-796.
- [12] Owen R W, Tenneson M E, Bilton R F, et al. The degradation of cholesterol by *Escherichia coli* isolated from human faeces[J]. *Biochem Soc Trans*, 1978, 6: 377-379.
- [13] Saden-Krehula M, Tajic M, Klobah D. Testosterone, epitestosterone, and androstenedione in the pollen of scotch pine *P. silvestris* L[J]. *Experientia*, 1971, 13: 108-109.
- [14] Durhan E J, Lambright C, Wilson V, et al. Evaluation of androstenedione as an androgenic component of river water downstream of a pulp and paper mill effluent[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21: 1973-1976.
- [15] Hegrenes S G. Masculinization of spawning channel catfish in the Red River of the North[J]. *Copeia*, 1999: 191-194.
- [16] John D Carson, Ronald L Jenkins, Elizabeth M, et al. Naturally occurring progesterone in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): A major steroid precursor of environmental androgens[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27(6): 1273-1278.
- [17] Roy P K, Khan A W, Basus K. Transformation of sitosterol to androst-1, 4-diene-3, 17-dione by immobilized *Mycobacterium* cells[J]. *Indian J Biochem Biophys*, 1991, 28: 150-154.
- [18] Takeo J, Yamashita S. Two distinct isoforms of cDNA encoding rainbow trout androgen receptors[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 5674-5680.
- [19] Maclatchy D L, Vander Kraak G J. The phytoestrogen beta-sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 134: 305-312.
- [20] Munkittrich K R, Vander Kraak G J, McMaster M E, et al. Survey of receiving water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white sucker[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1994, 13: 1089.
- [21] 赵建亮, 应光国. 珠江典型河流中内分泌干扰物、药物和个人护理品的分布特征及其风险评价[D]. 广州: 中国科学院广州地球化学研究所, 2009.
ZHAO J L, YING G G. The distribution characteristics and risk evaluation of the endocrine disruptors, pharmaceuticals and personal care products in typical water of the Pearl River[D]. Guangzhou: Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, 2009.
- [22] Thomas K V, Hurst M R, Matthiessen P, et al. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002, 21: 1456-1461.
- [23] Blankvoort B M G, Rodenburg R J T, Murk A T J, et al. Androgenic activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: Indications for mixture effects[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2005, 19: 263-272.
- [24] Kolodziej E P, Sedlak D L. Rangeland grazing as a source of steroid hormones to surface waters[J]. *Environmental Science and Technology*, 2007, 41(10): 3514-3520.
- [25] 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: 346-352.
- [26] Orlando E F, Kolok A S, Binzick G A, et al. Endocrine-disrupting effects of cattle feedlot effluent on an aquatic sentinel species, the fathead minnow[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(3): 353-358.