

水产品中环境雌激素特性及检测技术研究进展*

Research Progress on Characters and Test Technologies of Environmental Hormone in Aquatic Products

卢安根¹, 黄志标¹, 杜寒春¹, 莫建光¹, 阮志华², 吴昌峰²

LU An-gen¹, HUANG Zhi-biao¹, DU Han-chun¹, MO Jian-guang¹, RUAN Zhi-hua², WU Chang-feng²

(1. 广西分析测试研究中心, 广西南宁 530022; 2. 广西大学, 广西南宁 530005)

(1. Guangxi Center for Analysis and Testing Research, Nanning, Guangxi, 530022, China; 2. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530005, China)

摘要: 环境雌激素会干扰生物体内雌激素的正常分泌, 使生物体的生殖功能或免疫功能出现异常。环境雌激素可以分为合成雌激素、生物源雌激素和环境化学污染物, 检测方法主要有气相色谱(GC)法、高效液相色谱(HPLC)法、气相色谱-质谱联用(GC-MS)法、化学发光免疫分析(CLIA)法、分子印迹(MIT)法。目前, 我国对环境雌激素的研究才刚刚起步, 未来的研究方向应该包括对新检测技术和降解方法的研究。

关键词: 水产品 环境雌激素 特性 检测技术

中图分类号: X502 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2011)03-0269-04

Abstract: The environmental estrogens can disturb the normal physiology metabolism by combining the receptor, causes the negative biological effects. Environmental hormone can be divided into synthesis hormones, biological source hormones and environmental chemistry pollutant. There are several detection methods for environmental hormone, including gas chromatography(GC), high performance liquid chromatogram(HPLC), gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS), chemiluminescence immune assay(CLIA) and molecular engraving(MIT). So far, research on the environment of estrogen has just started in Chinese, research in the future should include new detection technology method and degradation.

Key words: aquatic products, environmental estrogens, characters, detection technology

环境雌激素也称为“外因性扰乱内分泌化学物质”^[1], 它不是生物体自身分泌的雌激素, 是外界物质, 进入生物体后, 与生物体自身分泌的雌激素起相同的作用。它扰乱了生物体内雌激素的正常分泌, 使生物体的生殖功能或免疫功能出现异常。

在自然界, 环境雌激素的污染被认为是动物, 特别是水生动物生殖功能异常、雌雄同体率升高、性比例失调、生殖器官变异的重要原因^[2,3]; 它的污染被认为与近年来隐睾症、尿道下裂、子宫内膜异位、阴阳人、发育不全、精子数目减少以及活性下降等发病率的升高有关^[4~6]。对环境雌激素的研究已经成为

人类探索生殖障碍、发育异常、癌症等原因的热点之一。

1 环境雌激素的种类

根据来源不同, 环境雌激素可以分为合成雌激素、生物源雌激素和环境化学污染物等^[7]。

1.1 合成雌激素

该类激素是非甾体类雌激素, 与人或哺乳动物分泌的天然雌激素结构类似。这类激素以己烯雌酚为代表, 常见的还有了炔雌醇、烯雌醚、二乙基乙烯雌酚(DES)等。它们在自然环境中难以被分解或失活, 对雄性生殖系统产生不良影响^[8]。

1.2 生物源雌激素

该类激素包括植物性雌激素和真菌性雌激素。几乎所有植物均含有多种雌激素成分。现在已发现了400多种含有雌激素活性物质——异黄酮(黄豆苷原、染料水黄酮)和香豆雌酚的植物^[9]。异黄酮、

收稿日期: 2011-03-10

作者简介: 卢安根(1974-), 男, 博士, 高级工程师, 主要从事保健食品及生物产品分析测试研究。

* 广西科学基金项目(桂科回 0832015)资助。

香豆素类化合物拟雌内酯分别是大豆、大豆芽中的主要雌激素。近年研究发现,葛根、银杏、槐米、紫菀、桑寄生、桑叶、高良姜等的总异黄酮也具有雌激素活性,即使烹饪处理也难以去除这些活性。

真菌性雌激素主要由环境中的霉菌产生。比如禾谷镰刀菌产生的玉米赤霉烯酮是非类固醇的雌激素。玉米赤霉烯酮的主要代谢产物玉米赤霉烯醇也具有雌激素活性^[10]。

1.3 环境化学污染物

主要来源:含氯塑料垃圾的不完全焚烧;纸浆漂白以及汽车尾气产生的二噁英;电器产品和其它塑料制品中的多氯联苯、碳酸酯树脂、双酚 A;润滑油添加剂中的己二酸;农药中的 DDT 以及氯制剂农药;海洋防污涂料以及氯丹、水银、酞酸酯、壬酚等^[11]。

2 环境雌激素对人和水生动物的危害

2.1 对人的危害

环境雌激素对人的生殖系统、神经系统、免疫系统有很大的影响^[12],比如多氯联苯导致雄性动物雌性化、生殖能力低下,有机磷农药引起神经中毒症状,甲基汞导致精神失常等。环境雌激素还可以引起多种癌症和肿瘤,比如乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、卵巢癌、甲状腺癌、副睾丸囊肿、阴道腺癌、精巢癌等^[13~18]。

2.2 对水生动物的危害

水环境是环境雌激素最大的存储库。许多报道表明,在河流、湖泊、污水处理口等均有雌激素的富集^[19]。最早发现环境雌激素对水生动物产生危害的是英国。1985年在英国污水处理厂下游的河流中捕获具有雌雄两性特征的斜齿鳊鱼,之后在欧洲的大部分国家中也发现了类似的情况^[20]。Purdom等^[21]认为,广泛使用避孕药剂和随之而来的乙炔基雌二醇的释放是产生雌雄同体鱼的真正原因。20世纪90年代,美国的五大湖发现了鱼类雌性化、生殖器异常等现象,排入水中的天然或人工合成的环境雌激素是导致这些现象的主要原因^[22]。

3 环境雌激素的效应

3.1 累积效应

环境雌激素的化学性质稳定,难以自然降解。它通过食物链进入人和动物的血液、肝脏,并随着食物链的延长而不断浓缩和积累;它具有脂溶性,可以蓄积于人和动物体内的脂肪组织。以上两种积累途径均具有高蓄积性。环境雌激素进入机体后,生物

半衰期较长,可以在机体内长期蓄积,难以排出体外,累积效应不断增强。

3.2 交互协同效应

研究^[23]显示,单个环境雌激素对人和动物的影响较小。当多个或多种环境雌激素混合存在一体时,毒性是单个的上百甚至上千倍。这种现象通常被认为是环境雌激素的交互协同效应。虽然学术界还没有完全认同此效应,但是它表明了环境雌激素之间以及其内在性质之间可能会发生交互协同效应。

4 环境雌激素的检测方法

4.1 气相色谱(GC)法

GC法主要用于对土壤、沉淀物、水样、油样等环境样品中多氯联苯类化合物的测定。国内外许多研究^[24]采用毛细管GC-ECD法对多氯联苯类环境干扰物进行测定。这个方法具有定性、定量、准确、回收率高的特点。对各同系物的检出限,在水样品中为0.01~0.08ng/L;在土壤样品中为0.003~0.03μg/kg。

Shin等^[25]在检测酚类环境雌激素时,采用GC法,以氰甲基化试剂与BPA衍生反应生成氰甲基酯化物,以2,2'-联苯作为内标,用氮磷检测器检测。结果发现,BPA峰形和定量结果都非常好,线性范围0.1~100μg/L,定量下限0.1μg/L。

4.2 高效液相色谱(HPLC)法

HPLC法适合于对高沸点、大分子、强极性和热稳定性差的化合物的分离和分析,已成为应用最广泛和有效的分离、分析手段。徐靖等^[26]运用HPLC法测定塑料玩具中的16种环境雌激素。在萃取方法、流动相的选择、不同选择性UPLC色谱柱的分离效果等方面,讨论并确定最佳测定条件。结果表明,16种环境雌激素在ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱上获得了最理想的分离效果。该方法的回收率为93.6%~98.8%,RSD为0.5%~2.3%,检出限为0.11~0.76 ng。

周建科等^[27]以硅酸镁为固相分散剂,采用HPLC法对火腿肠中的己烯雌酚、己二烯雌酚、双酚A进行检测,样品检出限分别为0.05μg/g、0.1μg/g、0.05μg/g(S/N=3)。

4.3 气相色谱-质谱联用(GC-MS)法

GC-MS法就是将GC法与MS法联合使用,能够十分灵敏地检测到样品中的环境雌激素,定性强,可以适应待测样品环境内分泌干扰物种类繁

多的状况。

王楼明等^[28]运用顶空衍生固相萃取-气相色谱-质谱法检测了4-枯基苯酚和双酚A,建立了对聚碳酸酯树脂中酚类环境雌激素的定量测定方法。结果表明,4-枯基苯酚和双酚A的检出限分别为50ng/L和0.5ng/L, RSD ($n=5$)分别为5.2%和1.6%,平均回收率($n=3$)在90.5%~107.3%之间。

黄成等^[29]采用固相萃取-衍生化GC-MS法检测某制药厂污水中的雌(E1)、雌二醇(E2)、雌三醇(E3)和乙炔基雌二醇(EE2)4种环境雌激素。4种目标物的检出限为1.8~4.7ng/L,相对标准偏差为2.3%~9.1% ($n=8$)。目标化合物的加标回收率为(94.2±2.9)%~(101±3.8)%。表明采用GC-MS法能够简单、快速、灵敏地检测污水中的环境雌激素。

此外,在GC-MS法的基础上又发展了HRGC-HRMS(高分辨气相色谱-高分辨质谱)。此法比GC-MS更灵敏、定性能力更强,因此被广泛应用于对环境样品的分析。然而,由于仪器昂贵、前处理费时,而且维护复杂,我国仅有个别科研院校具备这种进口仪器,限制了我国环境分析化学研究的发展。

4.4 化学发光免疫分析(CLIA)法

CLIA法是将酶的化学发光与免疫反应结合起来。该法同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析的高选择性的特点,线性范围宽、标记物有效期长、无放射性危害、无污染、可以实现全自动化,操作简便快速和仪器简单经济,克服了传统方法的不足。在对环境内分泌干扰物的分析领域,CLIA法的优势非常明显。

Schneider等^[30]首次将CLIA法应用于对水中 10^{-12} 含量级别的乙炔基雌二醇浓度的检测,并对该方法进行了全面的验证。与以往的方法相比,该方法大大简化了前处理的过程,除了过滤不需要其它前处理操作。方法检出限为(0.2±0.1)ng/L。基于精确计算和对分析系统的参数优化调整,建立了线性范围为0.8~100ng/L的分析系统。将CLIA法应用于对不同样品体系中乙炔基雌二醇含量的测定,包括地表水和下水道排放的污水。所有的检测结果都用LC-MS-MS法进行验证,发现两种方法的线性关系都非常好,每一项结果的偏差均小于1ng/L。

4.5 分子印迹(MIT)法

MIT法是指通过制备能特异识别雌激素分子的新型聚合物,使聚合物与环境雌激素反应,根据聚

合物的荧光性和特异吸附性来快速检测环境雌激素。该法是化学和生物学交叉学科的新兴领域之一,在近三十几年内得到了蓬勃发展。Rachkov等^[31]采用一种MIT与液相色谱联用的方法检测出浓度为0.1~4 μ mol/L的17- β 雌二醇。此法检测时间短,具有优良的检测性,并且可以再生应用;刘峻等^[32]采用MIT法,用丹磺酰氯与17- β 雌二醇合成17- β 雌二醇荧光标记物,通过该标记物快速检测复杂介质中的17- β 雌二醇。

MIT法也可以快速、准确地测定其它环境雌激素。Javier等^[33]采用本体聚合的方法,制成玉米赤霉稀酮的分子印迹物,通过与液相色谱联用,检出限达到 2.5×10^{-5} mol/L; Migaku Kawaguchi等^[34]采用悬浮聚合的方法,将经过同位素标记的双酚A制成分子印迹聚合物,用其作为固相萃取填料,检测水中的双酚A,检出限达到1 μ g/L。

5 研究展望

环境激素的污染是继臭氧层破坏、温室效应之后的又一全球性环境问题,已经成为国际上环境科学领域的热门课题。发达国家以巨大的投入开展研究。我国对环境激素的研究才刚刚起步,并且只限于对生物的实验效应的研究和对人类和其它生物的危害的初步调查。未来的研究应该包括以下两点:

(1)对新检测技术的研究。目前对环境雌激素的检测,仍以昂贵、复杂的化学分析方法为主^[35]。许多生物技术虽然已经介入对环境雌激素的监测领域,但要发展为成熟稳定、系统规范、便捷实用的检测方法,仍需进行大量的研究工作。生物标志物的发展为对环境雌激素检测方法的研究提供了新的突破点。对生物标志物的检测,不仅有助于研究暴露-效应关系,而且有助于对毒性效应的早期预警。另外,生物传感器、生物芯片具有便捷、灵敏、高效、易规范应用等优势,为环境雌激素检测方法的发展开辟了一条崭新的思路。对与环境雌激素检测有关的生物标志物的研究以及生物传感器、生物芯片和各类自动化生物检测盒的开发将是今后环境雌激素的检测方法的重要发展方向。

(2)对环境雌激素降解方法的研究。到目前为止,对环境雌激素降解方法的研究很少。生物降解方面还没有培养出有效的降解菌,降解速度比较缓慢。吸附处理也只能实现污染物的转移,而且对后续处理要求高。比较有前景的是光催化氧化,今后可以往这方面发展,研制出高效的催化剂,提高降解

的速率并尽可能大地降低环境雌激素的毒性。

参考文献:

- [1] 周英华. 危险的环境激素[J]. 张学库, 译. 家庭医生, 2003, 1(1): 15-20.
- [2] Milnes M R, Woodward A R, Rooney A A, et al. Plasma steroid concentrations in relation to size and age in juvenile alligators from two Florida lakes[J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2002, 131(4): 923-930.
- [3] Shelby J A, Mendonca M T. Comparison of reproductive parameters in male yellow-blotched map turtles (*Graptemys flavimaculata*) from a historically contaminated site and a reference site[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 129(3): 233-242.
- [4] 杜克久, 许晓白. 环境雌激素研究进展[J]. 科学通报, 2000, 45(21): 2241-2247.
- [5] 邓茂先, 陈祥贵. 环境内分泌干扰物研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(2): 65-68.
- [6] Sinawat S. The environmental impact on male fertility[J]. *J Med Assoc Thai*, 2000, 83(8): 880-885.
- [7] 蒋学之. 环境雌激素对人类健康的潜在影响[J]. 中国公共卫生, 1997, 13(4): 251-252.
- [8] Song T T, Hendrich S, Murphy P A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone[J]. *Agric Food Chem*, 1999, 47(4): 1607-1610.
- [9] 邱东茹, 吴振斌. 环境雌激素对动物和人体的影响及其作用机制[J]. 水生物学报, 1997, 21(4): 365-374.
- [10] 单妹, 许梓荣, 冯建蕾. 玉米赤霉烯酮对家畜繁殖性能和人体健康的影响[J]. 江西饲料, 2006(1): 28-31.
- [11] 朱建如, 宋毅. 环境激素及对人体的危害[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(6): 38-40.
- [12] 余楠, 舒为群. 环境雌激素与人类疾病[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2002, 23: 97-99.
- [13] 袁彦华, 孙连军, 郭秀兰. 多环芳烃化合物环境污染研究[J]. 环境与健康杂志, 1999, 16(3): 182.
- [14] Crisp T M, Clegg E D, Cooper R L, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis[J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (Suppl 1): 11-56.
- [15] 黄幸纤. 环境内分泌干扰化学物与人类健康癌变、畸变、突变[J]. 癌变、畸变、突变, 1999, 11(6): 280.
- [16] Olea N, Pazos P, Exposito Inadvervent exposure to xenocstrogens Eur[J]. *Cancer Prey*, 1998, 7 (Suppl 1): 17-23.
- [17] 朱心强. 外来雌激素其对雄性生殖系统发育的影响[J]. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(4): 212-215.
- [18] 吴永宁. 环境化学信号传递在环境化学品内分泌干扰效应中的作用[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, 27(2): 69-72.
- [19] Jurgens M D, Holthaus K I E, Johnson A C, et al. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers[J]. *Environmental Toxicolgy And Chemistry*, 2002, 21(3): 480-488.
- [20] Petrovic M, Eljarrat E, de Alda M J, et al. Recent advances in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 974(1/2): 23-29.
- [21] Purdom C E. Atypical modes of reproduction in fish[J]. *Oxf Rev Reprod Biol*, 1984, 6: 303-40.
- [22] 刘先利, 刘彬, 邓南圣. 环境内分泌干扰物质研究进展[J]. 上海环境科学, 2003, 22(1): 57-63.
- [23] Arnold S F, Klotz D M, Collins B M, et al. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals[J]. *Science*, 1996, 272 (5267): 1489-92.
- [24] 董亮, 封跃鹏, 彭鸿俊. 环境样品中 PCBs 的测定[J]. 中国环境监测, 2002, 18(1): 352-358.
- [25] Shin H S, Park C H, Park S J, et al. Sensitive determination of bisphenol A in environmental water by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection after cyanomethylation[J]. *Chromatogr A*, 2001, 912: 119-125.
- [26] 徐靖, 陈兴宇, 朱静波, 等. 高效液相色谱对塑料玩具中 16 种环境雌激素同时测定[J]. 生态环境学报, 2010, 19(4): 826-829.
- [27] 周建科, 赵瑞峰, 王双立. 基质固体分散-液相色谱法测定火腿肠中酚类环境雌激素[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 528-530.
- [28] 王楼明, 李英, 刘丽, 等. 顶空衍生固相微萃取-气相色谱质谱法测定聚碳酸酯树脂中的环境雌激素[J]. 分析实验室, 2006, 25(8): 79-83.
- [29] 黄成, 姜理英, 陈建孟, 等. 固相萃取-衍生化气相色谱/质谱法测定制药厂污水中的环境雌激素[J]. 色谱, 2008, 26(5): 618-621.
- [30] Schneider C, Scholer H F, Schneider R J. Direct sub-ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 551 (1-2): 92-97.
- [31] Rachkov A, Minoura N. Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1544(1-2): 255-66.
- [32] 刘峻, 林汉华, 隋洪艳, 等. 内分泌干扰物 17- β 雌二醇荧光分子迹识别方法[J]. 环境科学研究, 2006, 19(5): 91-95.
- [33] Fernando Navarro-Villoslada, Javier L Urraca, Guillermo Orellana, et al. Zearalenone sensing with molecularly imprinted polymers and tailored fluorescent probes[J]. *Sensors and Actuators B*, 2007, 121: 67-73.
- [34] Migaku Kawaguchi, Yoshio Hayatsu, Hisao Nakata, et al. Molecularly imprinted solid phase extraction using stable isotope labeled compounds as template and liquid chromatography mass spectrometry for trace analysis of bisphenol A in water sample[J]. *Analytica Chimica*, 2005, 539: 83-89.
- [35] 张立将, 尹立红, 浦跃朴. 环境内分泌干扰物检测方法研究进展[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(2): 156-160.

(责任编辑: 陈小玲)