

三种甾体激素在湛江海域的紫红笛鲷体内的残留调查

徐美奕¹, 方富永², 蔡琼珍¹, 黄霞云¹

(1. 广东医学院, 广东 湛江 524023) (2. 广东海洋大学, 广东 湛江 524088)

摘要: 本文采用放射免疫分析法测定了湛江海域养殖紫红笛鲷与野生紫红笛鲷肌肉中雌二醇、孕酮、睾酮三种甾体激素的残留量。结果表明, 在养殖紫红笛鲷与野生紫红笛鲷肌肉中均检出三种激素, 养殖紫红笛鲷肌肉中三种甾体激素的残留量分别是野生紫红笛鲷的 4.50、1.57、5.00 倍; 野生紫红笛鲷中的甾体激素残留量较低, 但仍能被检出, 可能与环境激素有关。实验研究提示, 放射免疫分析法可作为水产品中激素残留量的有效检测手段。

关键词: 甾体激素; 残留; 紫红笛鲷; 放射免疫分析法

中图分类号: R155.5; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)03-0075-03

Investigation of three kinds of Steroid Hormones in *Lutjanus argentimaculatus* in Zhanjiang Sea Area by Radioimmunoassay

XU Mei-yi¹, FANG Fu-yong², CAI Qiong-zhen¹, HUANG Xia-yun¹

(1. Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)(2. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: The contents of estradiol, progesterone and testosterone in muscle of *Lutjanus argentimaculatus* in Zhanjiang sea area were determined by RIA. It was found that the contents of the three steroid hormones in muscle of cultured *Lutjanus argentimaculatus* were 4.50, 1.57, and 5.00 times as those in wild *Lutjanus argentimaculatus*, respectively. The residue levels of steroid hormones in wild *Lutjanus argentimaculatus* were determined to be very low and were possibly correlated with environmental hormones. It suggested that RIA could be regard as an efficient method for determining the hormone residues in aquatic products.

Keywords: Steroid hormone; Residues; *Lutjanus argentimaculatus*; Radioimmunoassay

随着我国水产养殖业的快速发展, 养殖者为了提高养殖效率、防治水产动物病害, 在水产养殖中较多使用了激素类、抗生素类药物^[1]。激素类药物在水产养殖中通过蛋白质的同化作用, 能提高饲料转化率并促进水产动物生长, 提高水产动物的繁殖和生产能力^[2,3]。这些激素一般较稳定, 不易被分解, 通过食物链进入人体后, 仍具有较强的生物活性, 对人体可产生致癌、损伤生殖功能、导致神经系统和免疫系统功能紊乱等严重危害^[4]。水产品质量安全不仅是关系国计民生的大事, 还引起国际的普遍关注, 特别是我国加入 WTO 后, 面临着全球经济一体化的形势, 面临着人们对安全、卫生水产品的要求日益增长及我国水产品养殖高质量、高效益、持续发展的局面, 我国水产品中的药物残留特别是激素类药物残留问题已经引起全社会的普遍关注^[1]。因此, 有效、快速、准确地检测水产品中激素残留量, 对于人类的健康和我国水

收稿日期: 2006-09-28

湛江市科技攻关项目(编号: 2006C06001)

作者简介: 徐美奕, 在读硕士, 高级实验师, 从事放射性应用的教学与研究

产养殖的可持续发展, 尤显必要与重要。

紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*), 属笛鲷科、笛鲷属, 为暖水性中下层鱼类。栖息于近海岩礁或泥沙底质海区, 主要分布于印度洋和太平洋中、西部, 我国产于南海和东海南部。其个体较大, 一般为 20~35 cm, 肉质鲜美, 是我国南方沿海省份重要的海水养殖鱼类^[5]。本文采用放射免疫分析法对养殖紫红笛鲷肌肉中雌二醇、孕酮、睾酮三种甾体激素残留量进行了检测, 并与野生紫红笛鲷的检测结果进行了对比分析。

1 材料与方法

1.1 材料

养殖紫红笛鲷购自湛江市坡头区海水养殖鱼排, 野生紫红笛鲷为在湛江海湾附近海面垂钓所得, 由广东海洋大学水产学院教授鉴定, 每组鱼各 6 尾, 鱼体情况见表 1。两组鱼采集于 2006 年 6 月, 均为待上市鱼, 鱼体健壮、鲜活。

表 1 实验用鱼的体长与体重

种类	体长/cm	体重/g
----	-------	------

养殖紫红笛鲷	25.60 ± 2.75	900.60 ± 75.21
野生紫红笛鲷	20.32 ± 2.56	528.25 ± 38.04

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器

1470 型 γ 计数器由美国 EG&G 公司提供, DL-8R 型冷冻离心机由上海离心机机械研究所提供。

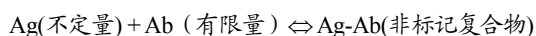
1.2.2 试剂

雌二醇、孕酮、睾酮药盒为 ^{125}I 标记的放射免疫分析试剂盒, 由天津九鼎医学生物工程有限公司提供, 甲醇(分析纯)由广州化学试剂厂提供。

1.3 实验方法

1.3.1 实验原理^[6]

实验采用的放射免疫分析法(Radioimmunoassay, RIA), 是建立在免疫反应基础上的核技术, 原理是放射性核素标记的抗原和被测抗原(或标准品)对有限量的抗体进行可逆性的竞争结合反应。



+



式中, Ag 包括标准抗原与待测抗原即样品, *Ag 是放射性核素标记的抗原, 与 Ag 为同种抗原, 对抗体(Ab)具有相同的特异结合能力, *Ag、Ag 与 Ab 以相同的结合率生成复合物, 复合物的多少取决于 Ag、*Ag 的浓度。当[Ag]高时, 生成的[Ag-Ab]也多。有限量的 Ab 被 Ag 结合多了, 与*Ag 结合生成的[*Ag-Ab]就少, 表现为*Ag-Ab 的放射性计数率降低。反之, 系统内[Ag]低时, 与*Ag 结合生成的[*Ag-Ab]多, 放射性计数率则升高。因此, *Ag-Ab 的放射性(cpm)与待测 Ag 的含量呈负相关关系。

1.3.2 激素提取^[3,7]

从鲜活实验用鱼的静脉取血, 分离血清供其它实验备用。将鱼洗净处死, 立即剥皮去鳞、刺, 用不锈钢手术刀切取可食肌肉部分, 用滤纸滤干水分, 取适量于均质器中绞成肉糜状, 称取 2.5 g 置于离心管中, 加入甲醇 5 ml, 用玻棒搅拌均匀, 漩涡振荡 1 min, 置于 55 °C 水浴中保温 20 min, 取出漩涡振荡 20 min, 以 3000 r/min 离心 20 min, 吸出上清液为激素提取液。

1.3.3 激素残留量检测

按照药盒提供的说明书进行操作, 通过多次预实验确定待测样品即鱼肉激素提取液所加入量为药盒建议量的 2 倍。在放免试管中分别加入雌二醇、孕酮、睾酮标准抗原或待测的鱼肉激素提取液、 ^{125}I 标记抗原、抗体, 在 37 °C 下的温育时间分别为 1.5 h、0.5 h、1 h, 待免疫反应达到平衡后, 4 °C 下离心(3600 r/min)

20 min, 弃上清液, 用 1470 型 γ 计数器分别测量各反应管沉淀物的放射性计数(cpm), 用 SPSS 统计软件绘制反应剂量曲线, 计算待测鱼肉中的激素残留量。

2 结果与分析

2.1 RIA 反应剂量曲线

对各激素标准反应管抗原抗体复合物的 cpm 值进行 Logit-Log 线性回归处理, 方程模式为 $y = ax + b$,

$$\text{其中 } y = \lg\left(\frac{B_x}{B_0 - B_x}\right) = \log it \frac{B_x}{B_0}, \quad x = \lg C, \quad B_0$$

为“0”浓度标准抗原与标记抗原对抗体的竞争结合复合物的 cpm 值, B_x 为除“0”浓度之外任意浓度标准抗原或待测抗原与标记抗原对抗体的竞争结合复合物的 cpm 值, C 为标准抗原或待测抗原浓度。三种激素反应剂量曲线的线性回归方程见表 2。

表 2 激素反应剂量曲线的线性回归方程

激素类型	线性回归方程	R 值
雌二醇	$y = -0.6922x + 1.4389$	0.9869
孕酮	$y = -0.5663x + 0.2884$	0.9999
睾酮	$y = -0.6426x + 1.2196$	0.9978

2.2 紫红笛鲷肌肉中三种激素残留量

分别依据三种激素反应剂量曲线的线性回归方程, 对样品激素残留量进行了计算, 结果见表 3。

表 3 紫红笛鲷肌肉中三种激素平均残留量

种类	雌二醇(mIU/g)	孕酮(ng/g)	睾酮(ng/g)
养殖紫红笛鲷	45.89	1.85	0.40
野生紫红笛鲷	10.20	1.18	0.08
p	<0.01	<0.01	<0.01

从表 3 结果可见, 养殖紫红笛鲷肌肉中三种激素残留量均显著高于野生紫红笛鲷, 分别是野生紫红笛鲷的 4.50 倍、1.57 倍和 5.00 倍。

3 讨论

激素类药物作为水产动物养殖中的生长促进剂, 能加快水产动物的生长速度, 提高饲料的转化利用率, 改进品质, 显著提高养殖业的经济效率^[8]。雌二醇、孕酮、睾酮三种甾体激素, 其主要作用是调节鱼类的生殖行为, 在水产养殖生产中, 这些激素类药物常用于鱼类性转变^[9]。甾体激素在鱼类体内的残留, 通过食物链进入人体, 会使人的正常生理功能发生紊乱, 使小孩性成熟加快, 影响正常生长和发育。由于甾体激素在水产品中的残留对人类健康造成的严重危害, 国际上已立法禁止在水产养殖业使用这三种违禁激素

素。

本实验在养殖紫红笛鲷和野生紫红笛鲷肌肉中均检测出雌二醇、孕酮、睾酮三种甾体激素,养殖紫红笛鲷肌肉中的三种激素残留量明显高于野生紫红笛鲷。野生紫红笛鲷肌肉中的激素残留量较低,但也能检出,可能与湛江海湾水产养殖场较多,环境激素对野生紫红笛鲷的影响较大有关^[10]。

目前水产品中激素残留量分析方法主要是液相色谱法、气相色谱法等^[3,7],放射免疫分析法在水产品中激素残留检测中的应用尚未见文献报道。本实验采用¹²⁵I标记的放射免疫试剂盒检测水产品中激素残留量,具有放射性活度低、放射毒性小、对环境污染少的特点,样品预处理简单,灵敏度高,结果可靠,检测限量高于液相色谱法,可达ng~pg级,检测时间约4h,能在短时间内检测大量样品,能满足对出口养殖水产品中激素残留的检测要求,可作为养殖水产品中激素残留量的检测手段。

参考文献

[1] 杨先乐. 我国水产品的药物残留状况及控制对策[J]. 水产

科技情报,2003,30(2):68-71.

- [2] 王凌云,李洁珍,黎敏,等. 高效液相色谱法测定水产品中4种雌激素的残留量[J]. 化学分析计量,2005,14(4):38-40.
- [3] 张远,刘璞. 动物性食品中兽药残留问题及对策[J]. 肉品安全,2005,22(6):17-19.
- [4] 余楠. 环境雌激素与人类疾病[J]. 国外医学临床生物化学与检验分册,2002,23(2):97-99.
- [5] 张俊彬,黄良民. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 热带海洋学报,2004,23(5):50-55.
- [6] 程绍钧. 检验核医学[M]. 重庆:重庆大学出版社,2001.
- [7] 黄文繁,柳洁,何碧英. SPE-HPLC法测定水产品中4种雌激素残留量[J]. 现代预防医学,2005,32(8):1027-1028.
- [8] 张力,郑中朝. 饲料添加剂手册[M]. 北京:化学工业出版社,2000,32-46.
- [9] 陈俊玉,何建顺. 加强我国水产品药物残留控制的建议[J]. 福建畜牧兽医,2005,27(2):16-18.
- [10] Arecand H, Lias D, Benson WH. Fish reproduction. An ecologically relevant indicator of endocrine disruption[J]. Environ Toxicol Chem, 1998, 17: 49-57.

(上接第79页)

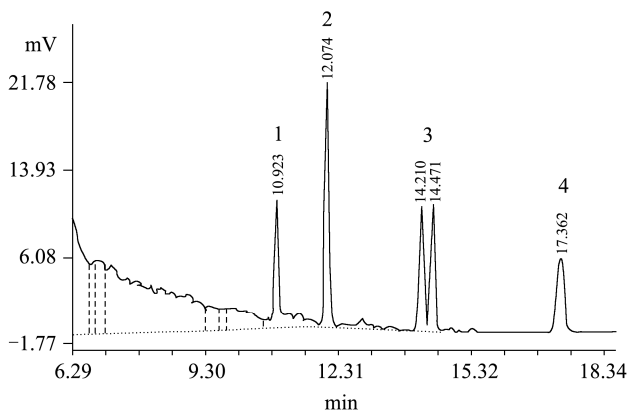


图3 样品加标色谱图

1. 对羟基苯甲酸甲酯; 2. 对羟基苯甲酸乙酯.; 3. 对羟基苯甲酸丙酯; 4. 对羟基苯甲酸丁酯

3 结论

应用毛细管气相色谱法在FID检测器上同时测定食品中4种对羟基苯甲酸酯类防腐剂。方法的线性范围较大,方法的检出限为2.0~3.2mg/kg,测定的回收率为78%~106%,相对标准偏差<11%。所建立的方法简便、快速、灵敏度高,并具有良好的精密度与准确度,可以满足食品中此类防腐剂检测的要求。

参考文献

- [1] 许文苑,林海禄,熊国宝,等. 对羟基苯甲酸酯合成研究进展[J]. 食品科技,2002(4):23~26
- [2] Darbre P D, Aljarrah A, Miller W R et al. J Appl Toxicol, 2004, 24(1):5
- [3] Nakagawa Y, Moldeus P. Biochem Pharmacology, 1998, 55(11):1907
- [4] 中国食品添加剂生产应用工业协会编著. 食品添加剂手册. 北京:中国轻工业出版社,1996
- [5] 李燕. 紫外分光光度法测定对羟基苯甲酸乙酯醇溶液的含量[J]. 药学实践杂志,1996,04:239-240
- [6] 朱玉,李永红. 薄层色谱法测定对羟基苯甲酸酯合成产物中对羟基苯甲酸酯的产率[J]. 分析化学,1998,01:120
- [7] 庞楠楠,迪丽努尔·马力克,牛蓓,廖一平,刘虎威. 快速气相色谱法测定食品中的常见防腐剂[J]. 分析实验室,2005,3:52-56
- [8] 王晓强,胡文炬,张军. 高效液相色谱法测定化妆品中对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J]. 色谱,1994,02:144-145
- [9] 刘青,林峰,蔡纯,梁伟大,谢钧宪. 液相色谱法测定中药合剂和糖浆剂中的防腐剂[J]. 检验检疫科学,2003,3:22-24