

PAEs 类环境激素在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*) 脏器中代谢研究*

葛建^{1,2} 李明揆¹ 林芳¹ 赵进¹ 韩宝瑜²

(1. 中国计量学院生命科学学院 杭州 310018; 2. 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室 杭州 310018)

提要 利用 GC-FID 建立了草鱼血清、肝胰脏、小肠及肝细胞培养液中邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸丁基苄酯(BBP)和邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)同时检测方法, 并利用 LC-MS/MS 方法进行了 DEP、DBP、BBP 及 DEHP 在草鱼脏器中的代谢规律研究, 以揭示邻苯二甲酸酯类(Phthalic Acid Esters, PAEs)化合物在草鱼体内的致毒机制。结果表明, DEP、DBP、BBP 和 DEHP 在草鱼肝细胞中未见明显代谢, 但在草鱼血清、肝胰脏匀浆液和小肠匀浆液中均出现不同程度的代谢, 其中血清代谢较迅速, 其主要代谢产物为相应单酯类化合物, 包括邻苯二甲酸单乙酯(mEP)、邻苯二甲酸单丁酯(mBP)、邻苯二甲酸单苄酯(mBzP)及邻苯二甲酸-单-乙基己基酯(mEHP)。由此说明邻苯二甲酸酯类在草鱼脏器中主要被组织水解酶所水解, 血液和小肠是此类化合物经鳃和口染毒的第一代谢转化场所。

关键词 草鱼, 邻苯二甲酸酯类, 气相色谱, 液相色谱-质谱联用

中图分类号 X503.225

邻苯二甲酸酯(Phthalic Acid Esters, 简称 PAEs)是一类重要的有机化合物, 主要作为增塑剂, 广泛用于塑料、油漆、化妆品等行业的生产。PAEs 常温下呈无色油状粘稠液体, 与塑料基质之间不形成共价键, 而是以氢键和范德华力连接, 彼此保持各自独立的化学性质, 因此极易溶出、释放, 目前在水体、土壤、大气及生物体乃至化妆品、食用油中均被检测到, 已成为全球最普遍的污染物之一(李明揆等, 2011; Katerina *et al.*, 2007; 曾巧云等, 2006; 谭君等, 2008; Hiroyuki *et al.*, 2004)。近年来研究表明, PAEs 具有多种毒性, 能引起动物致畸和致突变作用, 并显示较强的生殖和内分泌毒性, 国内外已将 PAEs 归类于环境激素(Veronica *et al.*, 2004; Makoto *et al.*, 2000)。由于在水域环境广泛分布, 已经对水生动物产生重要影响(李正炎等, 2008; 黄长江等, 2006)。

此外, PAEs 类化合物能够引起藻类、微生物、斑

马鱼及金鱼毒性作用, 致对虾血细胞凋亡(陈莉等, 2008; 林玲等, 2008; 胡芹芹等, 2008; Chen *et al.*, 2005; 吴琼等, 2010)。目前国内外已有 PAEs 类在动物和微生物体内代谢的报道(李文兰等, 2007), 笔者也曾开展了 DMP 和 DEP 在乌鳢、罗非鱼等水生动物体内的代谢动力学和残留规律研究(李明揆等, 2011; 戴贤君等, 2011), 但未见有在鱼组织器官中代谢研究的报道。同时也有研究指出, DBP 的代谢产物邻苯二甲酸单丁酯具有较强的毒性, 能够引起小鼠睾丸间质细胞雄性激素代谢紊乱(Wang *et al.*, 2006, 2007), 导致机体内分泌失衡。

因此, 本研究选取 DEP、DBP、BBP 及 DEHP 等 PAEs 类化合物为研究对象, 开展其在草鱼不同组织器官中的代谢研究, 以此深入揭示 PAEs 类化合物致毒机制及毒理学效应, 阐明此类化合物在鱼体内代谢特征, 为 PAEs 类化合物安全性评价及环境和生态

* 国家自然科学基金资助项目, 31100499 号; 浙江省自然科学基金资助项目, Y3080255 号、3100375 号; 浙江省分析测试计划项目, 2011C37044 号。葛建, 博士, 副教授, E-mail: gejian16888@163.com; 李明揆, 同等贡献作者, E-mail: xiulianlu@163.com

通讯作者: 韩宝瑜, E-mail: han-insect@263.net

收稿日期: 2010-12-15, 收修改稿日期: 2011-02-21

毒理学相关研究提供参考和借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用健康草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)试验前在水族箱中暂养,草鱼肝细胞系由上海海洋大学农业部渔业动植物病原库提供,编号为BYK-C12-01。M199培养基购于杭州兰堡生物实验用品有限公司,28℃充2% CO₂培养。

DEP、DBP、BBP及DEHP标准品(纯度99%以上),邻苯二甲酸单乙酯、单丁酯、单苄酯、单-乙基-己基酯标准品(纯度99%以上)购自上海百灵威化学有限公司(SIGMA公司产品);内标为苯甲酸苄基酯标准品(BB),购于SIGMA公司,甲醇为HPLC级,乙酸乙酯和正己烷为分析纯,购自杭州米克化工仪器有限公司。

1.2 仪器与方法

安捷伦6890气相色谱仪,氢火焰离子化检测器(FID),毛细管柱为HP-5色谱柱(0.25μm,30m×0.25mm),载气为高纯氦气,燃烧气体为高纯空气和高纯氢气,载气流速为40ml/min;不分流进样,体积为1μl。升温程序为:80℃保持1min,以30℃/min升至235℃,保持15min,以4℃/min升至290℃,保留1min,进样口温度为280℃,检测器温度为300℃。

LC-MS/MS系统为Waters ACQuity UPLC超高速液相,Thermal LCQ质谱,ESI电离源,流动相为甲醇-0.2%冰醋酸水溶液,流速0.2ml/min,梯度洗脱,时间0—8min,甲醇10%—40%;8—9min,甲醇40%—50%;9—15min,甲醇50%—80%;15—19min,甲醇80%;19—20min,甲醇80%—10%,紫外检测波长254nm,柱温30℃,色谱柱为ACQuity UPLC BEH-C18柱(2.1×50mm,1.7μm),鞘气流速10L/min,辅助气流速2L/min,毛细管温度320℃。

1.3 组织样品处理

将DEP、DBP、BBP及DEHP混合标准液分别加入1ml血清、肝胰脏匀浆液、小肠匀浆液及肝细胞培养液中,使其终浓度为20μg/ml,30℃温孵,分别于0、5、30、120min取样,加入内标后迅速加入6ml乙酸乙酯终止反应,漩涡提取2min,6000r/min离心8min,取出有机层于水浴中氮气挥干,加入0.4ml正己烷,17000r/min高速离心3min后,吸取上清液1μl进行GC分析。

1.4 GC分析方法建立

将DEP、DBP、BBP及DEHP标准品溶解于甲

醇溶液中,然后分别稀释成1.25、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0μg/ml系列标准液,向离心管中各加入标准液及内标BB,再向上述每个离心管中各加入1.0ml空白肝胰脏、小肠匀浆液、空白血清及肝细胞匀浆液。按照1.3方法处理后进样分析,以毒物峰面积与内标峰面积之比(Y)为纵坐标,以质量浓度(X)为横坐标作标准曲线,求出标准曲线方程和相关系数(r)。选择1.25、5.0、20.0μg/ml作为质控样品(QC),按照1.3处理后进样分析,每个浓度样品重复5次,计算方法回收率和精密度。

1.5 代谢产物LC-MS/MS分析

参照1.3,将DEP、DBP、BBP及DEHP混合标准液分别加入1ml血清、肝胰脏匀浆液、小肠匀浆液及肝细胞培养液中,30℃温孵120min后,加入6ml乙酸乙酯终止反应,漩涡提取、离心后,取出有机层于水浴中氮气挥干后,加入1.0ml甲醇,漩涡振荡,17000r/min离心3min,吸取上清液10μl LC-MS/MS分析。

2 结果与分析

2.1 PAEs化合物GC特异性分析

在选定的GC和LC-MS/MS色谱和质谱分析条件下,DEP、DBP、BBP及DEHP分离良好,通过空白组织添加样品以及体外代谢后组织样品的气相色谱图,结果表明在相应保留时间处均无干扰峰出现。由于气相色谱的毛细管柱在分离度上较高效液相色谱高,所以本研究在样品的前处理就比较简单,而且样品中的杂质并不干扰DEP、DBP、BBP、DEHP及内标BB的分离。

2.2 样品前处理和分析方法的建立

在本试验提取方法和色谱条件下,在1.25—40.0μg/g或μg/ml浓度范围内,线性关系良好(表1),利用线性回归方法计算出斜率、截距以及相关系数($r>0.99$)。

本试验建立的样品处理方法和色谱分析条件下,分别于线性范围内取高、中、低浓度1.25、5.0、20.0μg/ml制备质控样品,DEP、DBP、BBP及DEHP在组织中的回收率均达85%以上,日内和日间变异系数均小于10%,说明该毒物在组织中回收率和精密度均符合检测要求(DEP结果见表2)。

2.3 PAEs类化合物组织中代谢后剩余浓度

将不同时间点代谢组织样品中DEP、DBP、BBP及DEHP峰面积与内标峰面积之比代入相应的曲线方程求出各组织中剩余浓度(表3),将DEP、DBP、

表 1 DEP、DBP、BBP 及 DEHP 曲线方程及相关系数
Tab.1 Regression equation and correlation coefficients of DEP, DBP, BBP and DEHP

组织	DEP	DBP	BBP	DEHP
血清	$Y = 0.0444X + 0.0094$ $r = 0.9998$	$Y = 0.0548X + 0.058$ $r = 0.9996$	$Y = 0.0692X - 0.0026$ $r = 0.9997$	$Y = 0.0749X + 0.0372$ $r = 0.9991$
肝胰脏	$Y = 0.0447X + 0.0021$ $r = 0.9996$	$Y = 0.0516X + 0.0435$ $r = 0.9996$	$Y = 0.0642X + 0.0064$ $r = 0.9999$	$Y = 0.0704X + 0.0234$ $r = 0.9999$
小肠	$Y = 0.0446X + 0.0288$ $r = 0.9998$	$Y = 0.054X + 0.0466$ $r = 0.9991$	$Y = 0.0674X + 0.0506$ $r = 0.9993$	$Y = 0.0744X + 0.0991$ $r = 0.9991$
肝细胞	$Y = 0.0435X - 0.0166$ $r = 0.9995$	$Y = 0.0796X - 0.0317$ $r = 0.9999$	$Y = 0.0834X - 0.0172$ $r = 0.9999$	$Y = 0.1100X + 0.0258$ $r = 0.9999$

表 2 不同组织中 DEP 回收率和变异系数
Tab.2 Recovery and Precision of DEP in different tissues

组织	添加浓度 (mg/L)	回收率(%)	精密性(%)	
			日内	日间
血清	1.25	85.41±8.29	6.82	9.71
	5.0	89.86±7.05	5.88	7.85
	20.0	90.36±6.27	6.94	7.86
肝胰脏	1.25	85.24±7.85	8.71	9.21
	5.0	91.13±9.01	6.28	9.89
	20.0	93.63±7.72	3.28	8.25
小肠	1.25	85.15±7.31	6.54	8.58
	5.0	90.78±8.16	5.64	8.99
	20.0	92.32±6.29	4.23	6.81
肝细胞	1.25	88.61±8.43	7.38	9.51
	5.0	90.82±8.21	5.26	9.04
	20.0	94.33±6.28	4.52	6.65

BBP 及 DEHP 分别加入上述各种匀浆液中, 经不同时间点取样分析, 检测表明, PAEs 化合物除在肝细胞中未见明显代谢外, 在其它组织中被迅速代谢, 尤其在血浆中代谢最为迅速, 其次为小肠和肝脏匀浆液。DEP 和 DBP 代谢结果见图 1(A、B)。

2.4 PAEs 类化合物代谢产物鉴定

将一定浓度的 DEP、DBP、BBP 及 DEHP 加入到血清、肝胰脏匀浆、肠匀浆以及草鱼肝细胞培养液中, 孵育不同时间(0, 5, 30, 120min)取样测定剩余含量, 结果表明: DEP、DBP、BBP 及 DEHP 在肝细胞培养液中未见明显代谢, 但在血清、肝胰脏匀浆和肠匀浆中被代谢。同时分析了各种组织匀浆中代谢产物的一级质谱和二级质谱, 结果表明 DEP、DBP、BBP 及 DEHP 的代谢产物 M1、M2、M3 和 M4 的质荷比分别为 193、221、255 和 277, 分别比 DEP、DBP、

表 3 不同孵育时间组织中 PAEs 类化合物浓度(μg/g 或 μg/ml)
Tab.3 PAEs concentrations of tissue within different intervals (μg/g or μg/ml)

组织	反应时间(min)	DEP	DBP	BBP	DEHP
血清	0	20.12±2.21	19.98±2.39	19.87±1.89	20.15±1.97
	5	19.67±1.75	6.35±0.83	6.48±0.62	19.22±1.63
	30	4.54±0.44	ND	ND	10.15±1.12
	120	ND	ND	ND	3.34±0.33
肝胰脏	0	20.17±1.19	19.01±2.09	19.28±2.12	20.19±2.16
	5	19.47±1.21	15.57±1.53	18.06±1.79	18.54±1.36
	30	12.72±0.88	6.64±0.59	10.65±1.04	13.01±0.94
	120	3.71±0.22	3.23±0.32	4.59±0.41	10.63±0.89
小肠	0	19.63±1.83	20.34±1.97	19.62±1.86	20.33±1.98
	5	13.34±1.27	6.41±0.62	10.84±1.19	15.57±1.56
	30	7.97±0.73	3.25±0.29	6.03±0.42	9.12±0.89
	120	1.73±0.021	ND	2.18±0.21	3.85±0.33
肝细胞	0	19.98±2.19	20.22±2.43	20.09±2.61	20.05±2.13
	5	18.45±2.39	19.23±1.91	20.17±1.98	19.36±1.82
	30	18.56±1.84	18.49±1.87	19.65±1.75	20.16±1.64
	120	18.48±1.77	18.67±1.76	19.76±2.01	19.68±2.04

注: ND 表示未检出

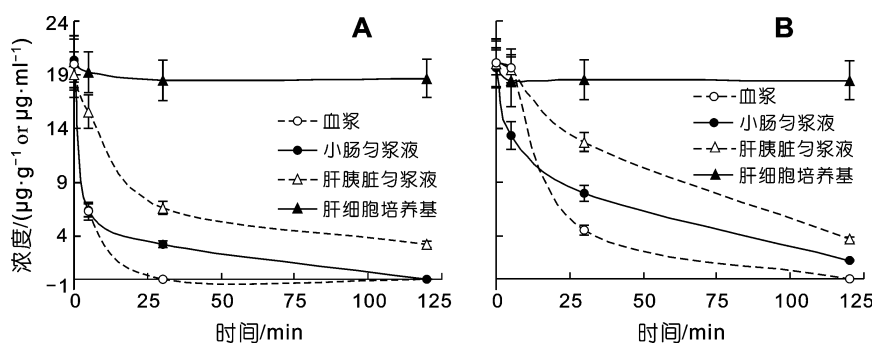


图 1 不同组织中 DEP(A)和 DBP(B)的代谢研究

Fig.1 Metabolism of DEP (A) and DBP (B) in different tissues

BBP 及 DEHP 少 29(乙基)、57(丁基)、57(丁基)、113(乙基-己基)。二级碎片离子 m/z 分别比分子离子峰减少 44, 推测代谢产物为其母体化合物结构上通过水解脱去乙基、丁基、丁基及乙基-己基(表 4), 因此推断 M1 为邻苯二甲酸单乙酯, M2 为邻苯二甲酸单丁酯, M3 为邻苯二甲酸单苄酯, M4 为邻苯二甲酸-单-乙基己基酯。同时利用 M1、M2、M3 及 M4 标准品进行 LC-MS/MS 分析, 结果验证了上述推断。

表 4 负离子模式 ESI 源下检测到的代谢产物质谱数据
Tab.4 Mass spectra data of metabolites in ESI source of negative ion mode

色谱峰代号	保留时间 (min)	分子离子峰	二级碎片特征离子峰
M1	8.26	193	149, 121
M2	11.42	221	149, 177, 193
M3	11.74	255	183, 211
M4	15.28	277	134, 233

上述研究结果表明, DEP、DBP、BBP 及 DEHP 在草鱼肝细胞中未见明显代谢, 在血清、肝胰脏及肠匀浆中被迅速代谢, 代谢产物主要是其相应单酯类化合物, 由此说明 PAEs 类化合物在鱼体内发生代谢的酶类并非肝细胞中的 P450 类混合功能氧化酶, 而是机体组织中的一些水解酶类。由于小肠、血液等器官组织是外源化合物经口、鳃等进入机体的重要途径和部位, 使得 PAEs 类化合物进入肝胰脏之前已经发生了生物转化, 因此小肠和血液系统是该类化合物经口和鳃途径染毒的第一代谢转化场所。

3 讨论

PAEs 类环境激素的检测方法主要采用 HPLC、GC、GC-MS 及 LC-MS 等, 由于 PAEs 脂溶性较强, 而且不同化合物极性相差较大, 故采用 HPLC 分析时,

须采用梯度洗脱方式来同时检测样品中多种化合物。由于梯度洗脱方式可引起基线漂移, 从而干扰样品分析, 导致灵敏度降低, 当检测生物样品时干扰更加明显。因此, 本研究采用 GC 来检测草鱼不同组织样品中多种 PAEs, 通过改变升温程序将待测物与内源性杂质较好分离。代谢结果表明 PAEs 在草鱼血清、小肠和肝胰脏匀浆液中代谢较迅速, 但在肝细胞中未见明显

代谢, 通过 LC-MS/MS 分析, 匀浆液中代谢产物主要是相应单酯类化合物, 由此说明 PAEs 在草鱼组织内主要通过水解酶水解, 肝细胞中 P450 混合功能氧化酶系统并未对其产生明显代谢作用。至于 PAEs 在鱼体内的代谢途径和机制尚需进一步研究。

有研究表明, PAEs 类化合物 DBP 的代谢产物邻苯二甲酸单丁酯(mBP)具有较强的毒性, 能够引起小鼠睾丸间质细胞内雄性激素代谢紊乱(Wang *et al*, 2006, 2007), 导致机体内分泌失衡。因此, 水环境中 PAEs 被水生动物富集、代谢后, 可能导致毒性增强。同时 PAEs 在环境中也易被其中的微生物所代谢, 产生各种代谢产物(李文兰等, 2007), 这些代谢产物由于毒性较强, 增加了对生态系统“二次污染”的风险。当水环境中 PAEs 类及其代谢产物随着食物链迁移进入人体后, 将会对人类的生殖内分泌系统产生重要影响。由此可见, PAEs 类化合物代谢产物在环境和动物体内的分析检测以及毒物代谢动力学和残留规律研究需要进一步探索, 同时 PAEs 及其代谢产物在食物链中的迁移规律及对人类的混合毒理学机制尚需深入研究。

综上所述, 本研究结果表明 DEP、DBP、BBP 及 DEHP 在草鱼血清、肝胰脏匀浆液和肠匀浆液中迅速代谢, 分别代谢成相应的单酯类化合物, 然而在草鱼肝细胞中未见明显代谢。因此, 血液和肠道分别为 PAEs 类环境激素经鳃和消化道染毒的第一转化场所。本文结果为进一步开展 PAEs 类化合物及其代谢产物生态毒理学机制研究提供了理论依据。

致谢 本研究在实验动物养殖、组织采集、匀浆以及样品前处理、GC、LC/MS 检测过程中, 得到了穆丹、王梦馨、刘丽芳、杨晶晶、林莉莎等同学的帮助, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 李文兰, 季宇彬, 张大雷等, 2007. HPLC/MSn 法鉴定环境激素邻苯二甲酸丁基苄酯在小鼠尿中的代谢产物. 环境科学, 28(3): 627—632
- 李正炎, 傅明珠, 卫 东, 2008. 胶州湾及其邻近河流中壬基酚等有机污染物的分布特征. 海洋与湖沼, 39(6): 599—603
- 李明揆, 葛 建, 林 芳等, 2011. 邻苯二甲酸二乙酯(DEP)在罗非鱼体内代谢动力学和残留研究. 海洋与湖沼, 42(1): 137—141
- 吴 琼, 刘 慧, 张 丹等, 2010. 邻苯二甲酸酯对浅层含水体沉积物微生物多样性的影响. 中国环境科学, 30(5): 671—676
- 陈 莉, 李学斌, 杨光涛等, 2008. 邻苯二甲酸二乙基己基酯(DEHP)对金鲫鱼脑细胞 DNA 的损伤. 生态毒理学报, 3(2): 144—148
- 林 玲, 王玉柱, 丁训诚等, 2008. 邻苯二甲酸二丁酯对斑马鱼胚胎发育毒性的研究. 卫生研究, 37(3): 278—280
- 胡芹芹, 熊 丽, 田裴秀子等, 2008. 邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对斜生栅藻的致毒效应研究. 生态毒理学报, 3(1): 88—95
- 黄长江, 董巧香, 马茹飞, 2006. 壬基酚对奥尼罗非鱼的急性毒性研究. 海洋与湖沼, 37(4): 309—315
- 曾巧云, 莫测辉, 蔡全英等, 2006. 邻苯二甲酸二丁酯在不同品种菜心-土壤系统的累积. 中国环境科学, 26(3): 333—336
- 谭 君, 林竹光, 刘仲华等, 2008. 固相萃取法分析水生生物体中 17 种酞酸酯类环境激素. 分析化学, 36(12): 1702—1706
- 戴贤君, 葛 建, 李明揆, 2011. 邻苯二甲酸二甲酯(DMP)在乌鳢体内的代谢动力学和残留. 中国兽医学报, 31(1): 77—80
- Chen W L, Sung H H, 2005. The toxic effect of phthalate esters on immune responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment. Aquatic Toxicology, 74: 160—171
- Hiroyuki Toda, Kaori Sako, Yuki Yagome *et al*, 2004. Simultaneous determination of phosphate esters and phthalate esters in clean room air and indoor air by gas chromatography-mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 519: 213—218
- Katerina Holadova, Gabriela Prokuphova, Jana Hajslova *et al*, 2007. Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. Analytica Chimica Acta, 582: 24—33
- Makoto E, Emiko M, Kunio K, 2000. Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Reproductive Toxicology, 14(1): 13—19
- Veronica S, Carmen C, Carmen A *et al*, 2004. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. Toxicology, 205(1—2): 131—137
- Wang Y B, Song L, Cui L B *et al*, 2007. Mono-butyl phthalate inhibits steroidogenesis by down-regulating steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse leydig tumor cells (MLTC-1). Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 70: 947—955
- Wang Y B, Song L, Hong X *et al*, 2006. Low concentrations mono-butyl phthalate stimulates steroidogenesis by facilitating steroidogenic acute regulatory protein expression in mouse leydig tumor cells (MLTC-1). Chemico-Biological Interaction, 164: 15—24

METABOLISM OF PHTHALIC ACID ESTERS IN *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* ORGANS AND HEPATOCYTE

GE Jian^{1,2}, LI Ming-Kui¹, LIN Fang¹, ZHAO Jin¹, HAN Bao-Yu²

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou, 310018; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, China Jiliang University, Hangzhou, 310018)

Abstract In order to reveal the toxicity mechanism of PAEs chemicals, the article developed a method for simultaneous determination of diethyl phthalate (DEP), dibutyl phthalate (DBP), butyl benzyl phthalate (BBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by using GC-FID. Meanwhile, the metabolism of four PAEs chemicals was also studied in *Ctenopharyngodon idellus* organs and hepatocyte through LC-MS/MS. The results showed that PAEs chemicals were not metabolized significantly in hepatocyte, but they were metabolized quickly in blood serum, intestinal tract and hepato-pancreas homogenate, especially in the serum. And the main metabolites were mono-phthalates, including monoethyl phthalate (mEP), monobutyl phthalate (mBP), monobenzyl phthalate (mBzP) and monoethylhexyl phthalate (mEHP). Therefore, it was concluded that the PAEs chemicals were mainly hydrolyzed by means of the proteolytic enzymes in *C. idellus* organs, and the blood and intestine were the first metabolized location of PAEs chemicals absorbed by the fish gill and intestine.

Key words *Ctenopharyngodon idellus*, Phthalic acid esters, GC, LC-MS/MS