

利用鱼肝中视黄化合物和 α -生育酚指示水污染毒性的探讨

张捷 徐盈 黎雯 吴文忠

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 利用高效反相液相色谱法检测了夏冬两季受有机氯污染的典型湖泊——鸭儿湖严家湖区鲢肝中的视黄醇, 软脂酸视黄酯及 α -生育酚的含量。结果表明, 两种营养素在鱼体内的代谢转换明显受环境温度的影响, 夏季外界温度较高, 肝脏内维生素主要以其生理活性形式存在, 表现出视黄醇及 α -生育酚含量较高; 而冬季外界温度较低, 肝脏内维生素主要以其储存形式存在, 表现出软脂酸视黄酯含量高。鱼肝中视黄化合物的浓度随氧化塘中污染物浓度的增加而呈现出有规律下降的显著剂量/效应关系, 表现在有机氯污染水域中鲢肝中的视黄化合物可作为一种生物标志物指示其污染毒性。

关键词: 视黄化合物; α -生育酚; 高效液相色谱; 有机氯污染

中图分类号: X131.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-327(2001)-02-0105-06

视黄化合物和 α -生育酚是维持动物体正常生理功能的两类重要营养素和外源激素。视黄化合物中以视黄醇(维生素A)的生理活性最高, 软脂酸视黄酯是视黄化合物在动物体内的主要储存形式, 而 α -生育酚具有迄今所知最高的维生素E活性。鱼肝及鱼肝油中富含视黄化合物及生育酚。多项研究表明: 水体的有机氯污染可导致鱼水肿、皮肤病变及肝肿瘤等多发疾病, 而这些病症又与鱼体内维生素A及维生素E的缺乏直接相关^[1-3]。最近哺乳类和鸟类实验研究的结果证明环境中的一些滞留性有机氯污染物, 如: 六氯苯(HCB)、多氯代二苯并二噁啉/呋喃(PCDD/F)等能与Ah受体结合, 诱导生物转化系统的酶活性, 增强体内氧化胁迫, 导致体内视黄化合物及 α -生育酚的含量下降^[4,5]。

鸭儿湖位于湖北省东部, 是典型的有机氯污染湖泊^[6]。由于附近氯碱化工厂排放的大量工业废水直接进入该湖, 造成水体严重污染。在鸭儿湖的三个子湖中严家湖受污染最严重, 其底泥中已检出高浓度的多种滞留性有毒污染物尤其是HCB和PCDD/F^[7,8]。本研究以严家湖区五个氧化塘为试验点, 采集各塘内的鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)鱼肝样品, 在前人研究工作的基础上^[1,6], 利用涡轮提取、反相液相色谱分离和二级管阵列检测技术, 研究了鱼肝中的视黄醇、软脂酸视黄酯和 α -生育酚及其含量随季节的变化。目的在于探讨利用鱼肝中的视黄化合物及 α -生育酚作为生物标志物指示水体污染毒性效应的可能性。

收稿日期: 1999-12-28; 修订日期: 2000-02-20

基金项目: 中国科学院九五重大(B)K2951-b1-210; 中国科学院水生生物研究所所长基金资助项目。

作者简介: 张捷(1974—), 女, 湖北省武汉市人; 硕士研究生; 研究方向: 生态毒理学

1 材料与方法

1.1 试剂与标样 正己烷为残留分析级(德国 Promochem 公司产),甲醇为国产色谱纯,无水乙醇为国产分析纯。标样:全反视黄醇、软脂酸视黄酯、 α -生育酚和乙酸维生素 E 均购自美国 Sigma 公司。试验期间,用无水乙醇定容储备标准液并遮光保存于 -20°C 。使用前,储备液用紫外分光光度计检测浓度,其实际浓度用比吸光系数计算($E_{\text{cm}}^{1\%}$:波长 325nm 处,视黄醇及乙酸视黄酯 1835;波长 292nm 处, α -生育酚及乙酸维生素 E 75.8)。标准工作液每天用经过检查的储备液稀释制备。

a.2 样品的采集与制备 分别于夏、冬两季采集严家湖五个氧化塘中一龄鲢,每塘 5 尾,每尾鱼重约 500—700g。样品采集后,立即解剖鱼体,小心将鱼肝与胆囊分离并迅速置于液氮中保存备用。

所有分析实验均在暗光下进行,并且用铝箔包裹全部实验用玻璃管,以减少维生素光降解可能造成的损失。准确称取 0.2g 鱼肝组织,以 1mL 蒸馏水为介质进行匀浆。取 200 μL 肝匀浆液加入 200 μL 乙酸维生素 E 内标,涡轮数秒混匀。加入 500 μL 正己烷猛烈涡轮 2min,提取维生素。以转速 1000r/min 离心 10min 后,收集样品提取液 500 μL ,氮气吹干,甲醇定容至 200 μL ,待 HPLC 分析。

1.3 分析条件 惠普 1100 型高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器,色谱柱为 4.0mm \times 250mm ODS(5 μm)-C18 不锈钢分析柱。流动相为 100% 甲醇。进样量 10 μL 。流速 1.0mL/min,柱洗脱在室温下进行($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$)。通过二极管阵列检测器在 200—400nm 范围的三维程序扫描,确定视黄醇、软脂酸视黄酯的最佳检测波长为 325nm, α -生育酚、乙酸维生素 E 的最佳检测波长为 292nm。检测程序为 0—4min,325nm 处检测视黄醇;4—12min,292nm 处检测乙酸维生素 E 与 α -生育酚;12—25min,325nm 处检测软脂酸视黄酯。通过标样与样品色谱保留值的比较及其紫外指纹图谱分析对样品中的视黄醇,软脂酸视黄酯及 α -生育酚定性,利用乙酸维生素 E 为内标进行定量。

1.4 标准校正 将 200 μL 标准工作液分别加入蒸馏水及肝匀浆液中,维生素的提取和检测步骤与上同。

1.5 数据处理及统计 每个塘内鲢肝样品的结果以平均数 \pm 标准偏差表示,并进行双因素方差分析,显著性水平 $P=0.05$ 。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离与检测灵敏度

如图 1 所示,在标样(A),鲢肝样(B)色谱图上,各目标化合物达到了很好地分离,视黄醇, α -生育酚,乙酸维生素 E,软脂酸视黄酯的保留时间分别为 3.33, 6.95, 8.65, 18.75min 左右。当响应值为 3 倍的噪音时,样品中视黄醇, α -生育酚及软脂酸视黄酯的最低检出浓度分别为 30.7, 804.8 和 607.1ng/mL。在上述鱼肝样品的谱图中,从 10—18min 还可见到一些小峰,这些小峰可能是代表分子中带短链或不饱和脂肪酸链的视黄酯化合物。

2.2 标样线性回归曲线

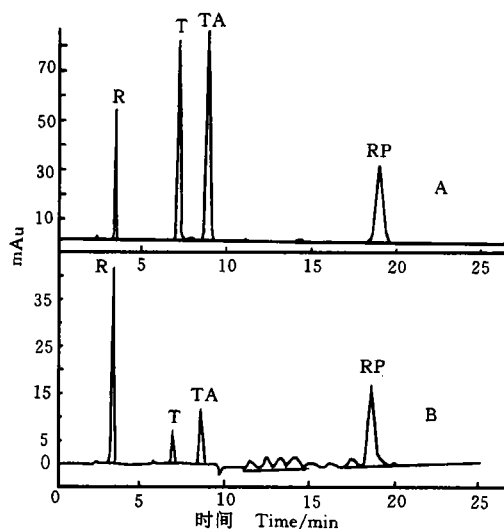


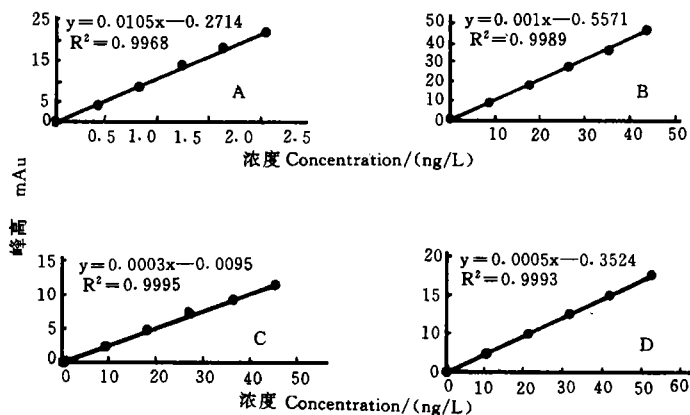
图1 标样(A), 鲢肝样(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for standard sample(A) and it liver sample of silver carp(B)

R: 视黄醇(Retinol); T: α -生育酚(Tocopherol); TA: 乙酸维生素 E(Tocopherol acetate),

RP: 软脂酸视黄酯(Retinyl palmitate)

下图为四种标准化合物在所采用的色谱分析条件下均有着很宽的线性范围, 且回归系数大于 0.99。



A 视黄醇标准曲线; B α -生育酚标准曲线; C 乙酸维生素 E 标准曲线; D 软脂酸视黄酯标准曲线

2.3 回收率及精密度

所获得的样品添加回收率结果列于表 1, 三种化合物标准添加回收率均在 90% 以上, 且平均标准偏差 5% 左右。

2.4 严家湖五个氧化塘鲢肝中视黄醇, 软脂酸视黄酯及 α -生育酚的含量

图 2 的结果显示出在严家湖鲢肝中, 维生素 A 和维生素 E 的最高生理活性形式——

表 1 视黄醇,软脂酸视黄酯和 α -生育酚的添加回收率Tab. 1 Fortified recovery of retinol, retinyl palmitate and α -tocopherol

	添加回收率 Fortified recovery (mean \pm S.D.) (%)		
	视黄醇 Retinol	软脂酸视黄酯 Retinyl palmitate	α -生育酚 α -tocopherol
蒸馏水 (n=5) Distilled water	96.2 \pm 3.4	94.3 \pm 5.3	95.6 \pm 1.4
肝匀浆液 (n=5) Liver homogenate	97.2 \pm 2.6	92.7 \pm 4.5	92.9 \pm 4.2

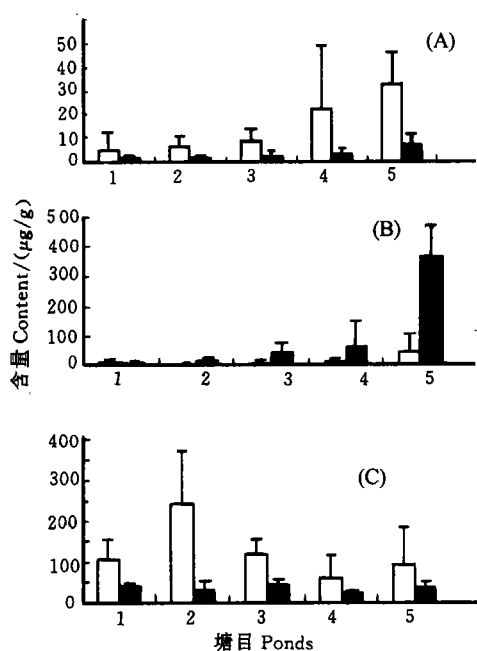


图 2 严家湖鲢肝中视黄醇(A),软脂酸视黄酯(B)及 α -生育酚(C)的含量, (n=5). 双因素方差分析: (A) $P < 0.005$; (B) $P < 0.05$; (C) $P < 0.05$

Fig. 2 The level of retinol (A), retinyl palmitate (B) and α -tocopherol (C) in liver of silver carp from five oxidation Ponds of Yanjia Lake (n=5). Two-factor ANOVA: (A) $P < 0.005$; (B) $P < 0.05$; (C) $P < 0.05$

视黄醇及 α -生育酚,其含量均表现出夏季明显高于冬季 ($P < 0.05$);而维生素 A 的主要储存形式——软脂酸视黄酯,其含量则为冬季明显高于夏季 ($P < 0.05$)。这说明两种营养素在鱼体内的代谢转换受环境温度的影响。夏季由于外界温度较高,鱼体代谢旺盛,肝脏内维生素主要以其生理活性形式存在,故表现出视黄醇及 α -生育酚含量较高;而冬季外界温度较低,鱼体代谢缓慢,肝脏内维生素主要以其储存形式存在,故表现出软脂酸视黄酯含量高。尽管如此,仍能清楚地看出,1[#]—5[#]氧化塘鲢肝中视黄醇及软脂酸视黄酯的含量逐塘呈梯度递增 ($P < 0.05$),这与 1[#]至 5[#]氧化塘内水质的逐步净化相一致。因为废水中的滞留性污染物通过水中颗粒物的吸附、悬浮与再悬浮作用,沿水流方向逐塘呈现出递减的浓度梯度^[8,9]。很显然,排入严家湖的工业废水中污染物如 PCDD/F、HCB 等对鲢有明显毒性,并且毒性效应随着污染物浓度的下降而减小。这些有机氯污染物主要通过 Ah 受体结合的途径,激活鱼体内 I 相解毒酶系,如细胞色素 P450 1A1 等各种氧化还原酶活性^[11];以及 II 相解毒系统,如葡萄糖苷酸转移酶等各种转移酶活性;干扰鱼体内视黄化合物的代谢平衡,加速其分解代谢,使

肝脏中视黄化合物含量下降^[5],此结果也与近年来国际上有关哺乳类和鸟类的实验结果相符^[4,5]。这种随氧化塘中有机氯污染物浓度的增加而表现出的鱼肝中视黄化合物浓度

呈有规律减少的趋势,表明可将鱼肝中的视黄化合物作为一种评价滞留性有机氯污染物毒性效应的生物标志物进行深入研究。

严家湖各氧化塘底泥中重金属的浓度与有机氯污染物含量相似,也随水流方向呈逐塘递减的趋势^[12],但在本研究中未发现鱼肝中维生素 E 的含量与塘内污染物浓度的相关性(图 2C)。这说明严家湖鲢鱼体内的氧化胁迫效应,与滞留性有机氯与重金属的复合污染效应有关。有机氯诱导各种氧化还原酶的活性使鱼体内氧化胁迫效应加强,自由基增多,而重金属既可能作为氧化剂增强鱼体氧化胁迫效应,也可能作为超氧化歧化酶及过氧化酶的重要组成部分消除鱼体内的自由基。有关更多水环境因子和污染物间相互作用对鱼肝中的视黄化合物和 α -生育酚含量的影响,尚有待结合室内实验进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Vince P P, Scott B B. HPLC determination of Tocopherol, retinol, dehydroretinol and retinyl palmitate in tissues of lake char (*Salvelinus namaycush*) exposed to coplanar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl[J]. *Environ. Toxicol. Chem.* 1994, 13:473—476
- [2] Harry T B, Esther E F, Martin L E, et al. Alteration in plasma and hepatic retinoid levels in flounder (*platichthys flesus*) after chronic exposure to contaminated harbour sludge in a mesocosm study[J]. *Aquat. Toxicol.* 1981, 42, 271—285
- [3] Stjhs S J, Shara M A, Alsharif N z, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced oxidative stress in female rats. [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1990, 106:126—135
- [4] Helen H. The role of retinoids in dioxin toxicity. Dioxin'97, Indianapolis, Indiana, USA. 1997, 34:402—405
- [5] Hakansson H, Manzoor E Ahlborg U G. Interaction between vitamin A and single oral doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on the TCDD-induced toxicity and on the vitamin A status in the rat [J] *Nutr. Sci. Vitaminol.* 1991, 37:239—255
- [6] Arnaud J, Fortis I. S. Blachier, et al. Simultaneous determination of retinol, α -tocopherol and β -carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. [J]. *J. Chromatogr.* 1991, 572:103—116
- [7] Spear P A, Bilodeau A Y, Branchard A. Retinoids: From metabolism to environmental monitoring[J]. *Chemosphere*, 1992, 25:1733—1738
- [8] Xu Y, Zhang Y Y, Oxynos K. et al. Hexachlorocyclohexane (HCH) residues in Ya-Er lake area, China[J] *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1994, 57:53—61
- [9] Wu W Z, Schramm K. -W, Xu Y, et al. PCDD/Fs, PCBs, HCHs and HCB in Sediment and soils of Ya-Er Lake Area in China: Results on Residual levels and correlation to the organic carbon and particle size [J], *Chemosphere*, 1997, 34:191—202
- [10] Chen G S, Schramm K. -W, Xu Y, et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon in Ya-Er Lake (Hubei, China): Source and Distribution [J]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 359:280—284
- [11] Chen G S, Xu Y, Xu L H, et al. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp [J]. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 1998, 40:234—238
- [12] 徐 盈,吴文忠,张银华,等. 湖北鸭儿湖地区六氯环己烷的残留动态与长期归宿研究,水生生物学报,1999,23(4):337—345

**STUDIES ON RETINIODS AND α -TOCOPHEROL IN LIVER OF
SILVER CARP (*Hypophthalmichthys molitrix*) FROM YAN-JIA
LAKE-HIGH ORANOCHLORINE POLLUTED LAKE**

ZHANG Jie, XU Ying, LI Wen and WU Wen-zhong

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430072)

Abstract: Retinol, retinyl palmitate and α -tocopherol were measured by reverse-phase HPLC in liver of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) from Yanjia Lake, high organochlorine polluted lake, in summer and winter, 1999. The results indicated that the biotransformation/metabolism of two nutriments were affected by ambient temperature. In summer while the temperature was higher, vitamins were mainly in their active forms, hence retinol and tocopherol levels in livers of silver carp were higher. But in winter while the temperature was lower, they were mostly in deposited forms, so retinyl palmitate was at higher level than that in summer. Furthermore, increasing trends of retinoids was significantly found in those samples from pond 1 to pond 5, showing a good dose-response relationship between water contamination and their toxic effects. It is considered that retinoids in fish liver might be used as an effective biomarker in assessing toxic effects of organochlorine pollution in waters.

Key words: Retinoids; α -Tocopherol; HPLC; Organochlorine contamination