

《内分泌干扰物检测 转基因斑马鱼法》

编制说明

一、任务来源及起草单位

1.任务来源

斑马鱼作为一种小型脊椎类模式生物，在全球范围内已有90多年的研究历史，在药品、保健食品及食品等领域的应用已得到大量相关领域企业的认可。斑马鱼试验既有体外试验快速、高效的特点，又具备哺乳动物试验相关性好、预测性高的特点，并且符合国际动物福利保护趋势，当下已经取得了显著的科研和产业化成果。

在此背景下，环特生物向中国乳制品工业协会提交了《内分泌干扰物检测 斑马鱼法》团体标准立项申请。中国乳制品工业协会组织专家召开的标准立项审核论证会通过了该团标的立项申请，并确定由杭州环特生物科技股份有限公司牵头承担标准起草任务。该项标准旨在建立类雌激素物质检测的新标准，弥补现有检测方法在检测敏感性和操作便捷性方面的不足。

2.起草单位及人员名单

起草单位：杭州环特生物科技股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、完美（广东）日用品有限公司、朴诚乳业（集团）有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、浙江省食品药品检验研究院、国家食品安全风险评估中心、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、宁波海关技术中心、君乐宝乳业集团、南京歆佳医药科技有限公司。

起草人名单：徐懿乔、朱晓宇、曹兵兵、解庆刚、毛新亮、高业成、张迎春、王飞飞、代荣波、贾旭东、刘姗、梁晶晶、赵超群、逯刚、董立雅、邱静、刘汉伟、黄亚芳、周佳丽、黄燕烽、缪文钰。

3.起草组分工

标准制订工作的组织、方法开发、方法验证和标准文本起草：杭州环特生物科技股份有限公司。

提供方法验证的样品、提供相关样品的标准方法测试数据、标准内容审核与修订：浙江省食品药品检验研究院、国家食品安全风险评估中心、宁波海关技术中心、南京歆佳医药科技有限公司。

标准内容审核与修订：黑龙江飞鹤乳业有限公司、完美（广东）日用品有限公司、朴诚乳业（集团）有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、君乐宝乳业集团。

二、标准编制的目的和意义

环境雌激素（Environmental Estrogens, EEs）是一类环境中存在的能干扰内分泌系统的正常生理和生化功能的化学物质，三大主要的EEs有1、生物来源雌激素，2、人工合成雌激素，3、环境化学污染物。乳制品中天然存在内源性雌激素，主要包括雌酮、 β -雌二醇、雌三醇，其中 β -雌二醇的活性最强，在正常情

况下含量很低，并不会扰乱人体的生理机能和激素代谢；另外还可能有人为添加的，属于人工合成的外源性雌激素，最具代表性的是二苯乙烯类合成雌激素，主要有己烯雌酚，己二烯雌酚，己烷雌酚等，它们可以进入动物体内，通过干扰动物体内源性雌激素的合成、分泌、转运、结合、活性反应、代谢、消解或产生类似生物体内源性雌激素的作用。而已烷雌酚、己烯雌酚、双烯雌酚都属于人工合成的雌性激素，是1, 2-二苯乙烯类化合物，具有促进动物生长的特性，作为生长促进剂用在牛羊等家畜的饲养过程中长期使用。多种可促进动物生长的代用物的效力都远不如己烯雌酚，以致使己烷雌酚、己烯雌酚、双烯雌酚特别是己烯雌酚等人工合成的雌性激素在动物生产过程中的使用禁而不止。现已证实这些人工合成的雌性激素可在动物的肝脏、肌肉中残留。如果人们长期食用这种激素含量较高的动物产品，会导致产生诸如儿童性早熟、成年人癌症等负面影响，因此应严格控制食品中雌激素的含量。

可检测有雌激素活性的物质的存在方法很多。理化检测通常检测的是结构已知的物质，但雌激素种类繁多，结构差异大，化学结构与生物活性的相关性难以预测。生物学检测可以很好模拟人病理吸收代谢机制，因此，在这种差异性大的检测指标中，生物学检测体现出极大的优势。

斑马鱼（Zebrafish）具有个体小、繁殖率高、生长周期短、胚胎透明、与人类基因的同源性高、易于进行转基因操作并得到基因突变体，成为研究脊椎动物环境毒理学的理想模式生物。斑马鱼已被欧美和中国监管部门广泛认可，欧洲经济与合作发展组织（OECD）已经颁布了10余项斑马鱼环境毒理学评价指南。OECD和日本的生殖毒理学家采用斑马鱼作为检测水环境内分泌干扰物浓度的早期敏感对象。斑马鱼中有三个基因与哺乳动物雌激素受体（ERs）同源：*era*（在斑马鱼中也称为*nr3a1*或*esr1*）、*erβ1*（*nr3a2a*或*esr2a*）和*erβ2*（*nr3a2b*或*esr2b*）。三种雌激素受体均可与雌激素响应元件（ERE）DNA序列结合，并以剂量依赖的方式激活胞内转录。

本标准应用转基因雌激素斑马鱼，建立类雌激素生物学检测新方法，弥补现有检测方法在检测敏感性和操作便捷性方面的不足，达到快速、高效、低成本的筛查品中潜在风险物质的目的，是对现行理化检测体系的重要补充与提升。

三、主要工作过程

1. 立项前调研工作（2022年04-06月）：

在前期工作的基础上，进一步开展了立项前的行业调研工作、召开了沟通会议，广泛听取行业意见和建议。杭州环特生物科技股份有限公司向中国乳制品工业协会提交了《内分泌干扰物检测 斑马鱼法》的团体标准制修订项目申请书。

2. 项目启动阶段（2022年07月）：

在与行业专家和相关企业充分沟通的基础上，2022年07月21日召开了标准立项审评会，提案单位进行了立项答辩。标准立项通过专家审核并在中国乳制品工业协会官网发布立项公告。随后成立了标准工作组。工作组由杭州环特生物科技股份有限公司、黑龙江飞鹤乳业有限公司、完美（广东）日用品有限公司、朴诚乳业（集团）有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、浙江省食品药品检验研究院、

国家食品安全风险评估中心、内蒙古蒙牛乳业（集团）股份有限公司、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、宁波海关技术中心、君乐宝乳业集团、南京歆佳医药科技有限公司的多位专家组成，正式启动标准制订工作。

3.形成标准草案（2022年08月-2024年02月）：

杭州环特生物科技股份有限公司等12家单位对加标奶粉的化学提取方法验证，斑马鱼对内分泌干扰物阳性和阴性化合物试验验证结果，形成标准草稿。

4.形成征求意见稿和编制说明（2024年03月-2024年05月）：

各标准制定参与单位对标准草稿进行了充分讨论，同时也多次向行业专家征求意见。标准编制小组在听取专家建议和意见的基础上，对标准草稿做了进一步的修改和完善，形成本标准征求意见稿。

四、编制原则

本标准的编制遵循下列原则：

1. 保证标准修订过程的科学性。
2. 保证标准执行过程的可操作性。
3. 充分考虑行业现状，符合我国保健食品行业发展需求和行业从业者的技术水平。

五、编制内容说明

1.方法原理

在雌激素作用下，雌激素受体（Estrogen receptor, ER）ERs的基因在肝脏中的表达会明显上调。因此，ERs的基因可以作为生物体内雌激素活性检测的典型生物标志物。本方法中使用的雌激素斑马鱼构建是以UAS-GFF基因表达调控系统为基础，利用优化重组的雌激素响应元件（ERE）驱动上游质粒GFF的表达，进而对下游UAS质粒中荧光基因eGFP表达进行调控。类雌激素物质能刺激5×ERE响应，激活GFF的表达，而GFF蛋白可与UAS结合，进而驱动绿色荧光蛋白（EGFP）的表达，从而达到方便、直观、动态检测环境类雌激素物质是否存在及其浓度的目的。

2.鱼种的选择

Tg（5xERE:GFF; UAS:EGFP）品系。

3.斑马鱼幼鱼的繁育

根据国内外斑马鱼相关试验的指南和标准，推荐将斑马鱼幼鱼的繁育水温控制在26-28.5℃。温度偏离这个范围的话，斑马鱼的发育会出现明显的延迟或加快，需要相应地调整试验方案。

在收集亲鱼新繁殖的胚胎时，需要用标准稀释水将胚胎清洗3遍左右，将胚胎卵膜上可能粘连的食物残渣、粪便清洗干净，尽量减少食物残渣和粪便中携带的微生物特别是真菌对胚胎发育和生长的影响。除了在收集胚胎时会发现部分死亡胚胎之外，有部分胚胎会因为存在自身的缺陷而在发育过程中死亡。因为

斑马鱼孵育的温度较高，所以死亡的胚胎很容易腐烂变质，如果清理不及时，就会导致水质恶化，同时影响其它胚胎的发育。根据斑马鱼的胚胎发育阶段特点，大部分先天因素导致的胚胎死亡发生在受精后6小时以内，因此，在胚胎受精后6小时左右或当天下班前进行清理；在胚胎受精后24小时再清理一次死胚胎，后续胚胎基本上很少会出现死亡。

在胚胎发育的过程中，随着胚胎植物极营养物质的消耗，会产生大量的代谢产物，这些代谢产物如果在水体中积累过多，也会导致水质恶化。因此，至少应该每天更换一次胚胎养殖水，每次更换不少于2/3的水体。

斑马鱼胚胎和幼鱼的孵育可以根据实际情况选择不同的容器，比如培养皿、广口罐、细胞培养板、烧杯等。在选择容器时，建议选择用惰性材料制成的容器。孵育时要注意培养皿中的斑马鱼胚胎和幼鱼的密度，通常建议每尾斑马鱼最少100 μL 液体，液体过少会导致斑马鱼生长空间不足，影响发育。对于斑马鱼幼鱼培养密度，建议6孔培养板每个孔不超过30尾，12孔培养板每个孔不超过20尾，24孔培养板每个孔不超过10尾，10 cm培养皿不超过150尾；对于广口罐和烧杯等大体积容器，建议斑马鱼胚胎和幼鱼的数量控制在500以内，避免密度过高导致水质迅速恶化、溶解氧过低。

4. 试验用水

成鱼的抵抗力和适应能力强，因此对水质的要求不是很严格，可用去离子水加入适量的人工海盐和碳酸氢钠（ NaHCO_3 ），使水体的重要参数保持在斑马鱼的适宜范围内即可（电导率维持在480~510 $\mu\text{S/cm}$ ，pH维持在6.9~7.2，总硬度（以 CaCO_3 计）维持在50~100 mg/L ）。

胚胎和幼鱼对水质的要求比成鱼严格，此外，为了减少水质波动对试验结果的影响，培养液的成分应尽量清晰。因此，胚胎和幼鱼的孵育建议使用标准稀释水（40 \times 标准稀释水配制方法： NaHCO_3 : 2.52 g, KCl : 0.22 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 11.76 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 4.932 g用去离子水定容至1L）。

5. 试验溶液

（1）样品的前处理。首先，考虑到斑马鱼实验体系对水质有严格的要求，一些营养丰富的样品在斑马鱼适宜生长的温度28.5 $^\circ\text{C}$ 容易引起水质污染，造成斑马鱼缺氧死亡。其次，内分泌干扰物的生物效应与浓度呈正相关，一些样品中内分泌干扰物相对浓度较低，需要增加样品中类雌激素的浓度。因此，建议样品通过化学提取进行前处理。具体方法如下：1）取10 g样品置于50 mL离心管中，共4管；2）分别向每个离心管中加入15 mL超纯水，涡旋1min，混匀，（水浴锅预热至35~40 $^\circ\text{C}$ ）超声5min，之后分别在每个离心管中加入22.5 mL乙腈，涡旋1min，混匀，超声5 min；3）分别向每个离心管中加入6.0 g氯化钠，涡旋1min，混匀1000 rpm，离心10min，将离心完的上清液装入离心管中；4）将含有上清液的离心管，放置到氮吹仪中，氮吹至干燥，加入4 mL甲醇复溶，随后将液体移入装有300 mg C18的5 mL离心管，涡旋30 s，于4000 rpm，离心1min，取净化过的上清液过0.22 μm 滤膜，进行过滤，收集液体。

（2）助溶剂的使用。食品的成分较为复杂，既含有水溶性成分，也含有脂溶性成分，还有一些不溶性成分（如超微粉碎后直接使用的原料粉、益生菌等）。为了让食品中的有效成分尽量溶解或均匀分散，有时候不得不使用一些助溶剂，包括有机溶剂和分散剂。本标准推荐使用的都是相关标准中推荐或者有相

关科研文献证明其对斑马鱼安全性的助溶剂。推荐的溶剂：丙酮、乙醇、甲醇、二甲基亚砷、二甲基甲酰胺、三甘醇。推荐的分散剂：聚氧乙烯化脂肪酸甘油酯、吐温 80、0.01%的纤维素甲醚、聚氧乙烯化氢化蓖麻油。

对于助溶剂的使用限量，根据长期积累的数据以及本标准涉及到试验内容的特点，本标准将助溶剂的浓度上限定为1%（W/V或V/V）。1%的浓度上限并不意味着所有助溶剂的终浓度都可以用到1%（例如乙醇不应超过0.5%）。在试验溶液配制不受影响的情况下，助溶剂的使用量通常不应超过0.1%。只有当样品溶解性确实不好且助溶剂安全性非常好的情况下，方可将助溶剂的终浓度最高增加到1%。如果样品配制过程中使用了本标准以外的的助溶剂或分散剂，则应设置溶剂对照组。

如果样品不能溶解、乳化或制备成均匀分散的悬浮液，则不适用于本标准的方法。

（3）试验溶液的pH。斑马鱼最适的pH是在6.8-7.5之间，pH6.0-8.5可以正常生长，短期内pH5.0-9.0也可以耐受。一旦pH值<5.0或者>9.0，即便是短期内也会对斑马鱼产生严重伤害。因此，在试验中要尽量使试验溶液的pH值维持在最适宜斑马鱼生长的范围内。如果加入样品后试验溶液的pH值有明显变化，不应该直接调节试验溶液的pH，因为会改变整个试验体系；应该调节样品贮备液的pH值，使其接近加入样品前试验用水的pH值。然后再重新配制试验溶液。

为了避免在调节pH的时候引入其它可能影响试验结果的化学物质，推荐使用HCl和NaOH来调节。为了避免因为调节pH导致贮备液的成分和浓度发生变化，在调节pH的过程中，贮备液的颜色不应发生变化、不能有气体或沉淀产生。

（4）在本标准的试验方法中，斑马鱼是直接暴露在样品溶液中，为了减少渗透压过高对斑马鱼正常生理活动的影响，对样品的测试浓度要设置一定的上限。根据经验，对于以小分子单体化合物为主要成分的样品（如维生素、矿物质），测试浓度上限定为1000 $\mu\text{g/mL}$ ；对于成分多样混合物（如天然植物提取物）或分子量<3 KD的大分子化合物的测试浓度上限为2000 $\mu\text{g/mL}$ ；对于液体样品，需要根据样品中的有效成分含量或者可溶性成分浓度来确定测试上限，通常用体积比表示。对于很难溶解或很难均匀分散的样品物质，水溶暴露后很难保证斑马鱼的有效吸收，应考虑对样品必要的前处理或改用水溶暴露以外的其它处理方式。根据OECD 236指南的内容，对于分子量 ≥ 3 KD的大分子化合物，因为生物利用度的限制，不适合采用水溶暴露方式，应考虑对样品必要的前处理或改用水溶暴露以外的其它处理方式。

（5）在日常的试验过程中，发现有一些单体成分或者天然提取物自身会产生荧光信号。如果样品产生荧光的条件（激发波长和发射波长）与内分泌干扰物诱发的绿色荧光相同，就会对试验结果产生一定的干扰，不适用于本标准的测试方法。

（6）每次试验前需要测试一次样品溶液的溶解氧和pH，以确保样品溶液的溶解氧和pH在正常的范围内，避免水体环境对试验结果的干扰。在本标准规定的评价方法下，换液时进行一次测试即可，试验终点不需要再次测试。

6.斑马鱼发育阶段和给药阶段的选择

选择的是早期发育过程中的斑马鱼，这个阶段斑马鱼发育较快，受精后不同天数的斑马鱼生理状态会

有很大的差别。因此，斑马鱼发育阶段的选择就非常重要。

受精后3天的斑马鱼肝脏开始发育，受精后5天肝脏发育完全。当Tg（5xERE:GFF; UAS:EGFP）品系接触到内分泌干扰物，绿色荧光在肝脏表达，因此，发育阶段必须选择受精后3天及以后。通过大量试验发现，斑马鱼暴露在内分泌干扰物中24小时后（即给药阶段为24小时），肝脏即可表达绿色荧光。考虑到受精后5天肝脏发育完全，形态完整，便于数据分析，发育阶段选择受精后4天。

7.斑马鱼数量的选择

为了避免因斑马鱼个体异常或死亡导致试验数据不满足统计学要求的情况发生，在造模和样品处理阶段，每组的斑马鱼数量应不少于20尾，除特殊情况外，每组的斑马鱼数量不用超过30尾。

8.样品浓度设计

在进行正式试验之前，会通过预试验来确定正式试验的浓度设计。

对于一些已经有其它试验数据的样品，可以从两个维度来确定斑马鱼预试验的浓度设计：（1）根据已有的其它试验数据推算而来斑马鱼试验浓度，（2）样品自身特性所决定的测试上限。当推算得出的试验浓度超出本标准所规定该类别样品的测试上限或样品自身的溶解度上限时，以测试上限或溶解度上限为预试验的最高浓度，然后向下设计一系列浓度，其中需要包含推算得出的试验浓度；当推算得出的试验浓度不高于本标准所规定该类别样品的测试上限和样品自身的溶解度上限时，可以将推算得出的试验浓度作为中间浓度来设计预试验一系列浓度。

对于没有其它试验数据的样品，直接根据样品自身特性所决定的测试上限（本标准所规定该类别样品的测试上限或样品自身的溶解度上限）来设计试验浓度。

根据经验，预试验的样品试验浓度范围跨度不应小于10，浓度范围跨度过小，可能无法通过预试验确定样品的无可观察毒性效应浓度（NOEC）；同时，浓度的间隔系数不大于3.2，浓度的间隔系数过大，可能导致试验确定的NOEC值远小于真实的最高安全浓度，导致后续正式试验的测试浓度偏低，可能影响试验结果的准确性。正式试验的样品浓度的间隔系数同样不能大于3.2，样品的浓度组别数可以根据需要设置，一般不应少于3组。浓度间隔系数过大或者浓度组别过少，可能都会导致试验结果的偏差，无法充分反映样品的雌激素效应强弱及其量效关系。

9.显微镜拍照

随机选取至少10尾斑马鱼用甲基纤维素固定在体视（荧光）显微镜下观察拍照，拍照部位为从斑马鱼头部至卵黄囊，通常需要采集完整的全身明场图片用于制作示意图。拍照时斑马鱼应头朝左、腹部朝下、完全侧躺，所有斑马鱼的体位应该保持一致。

照片的拍摄效果主要取决于显微镜的放大倍数和光源条件等，要求背景干扰小、图像清晰、定量区域肝脏完全落在视野范围之内。实际工作中，可以根据实验室显微镜的配置情况适当调整拍照参数，但同一次试验应当在相同的条件下进行拍照，通常要求体视显微镜的放大倍数不低于20倍，拍照系统的像素不低于2000万。

10. 图像分析

拍照完成后，可以使用荧光显微镜厂家配备的图像分析软件或者其它的专业图像分析软件进行分析。在分析时，将斑马鱼肝脏设置为感兴趣区域（ROI, region of interest），分析ROI的荧光强度总和值（或其它类似指标）。有些图像分析软件可以直接计算ROI的光密度总和，有些图像分析软件只能通过分别计算ROI总面积和光密度平均值来计算得到ROI的光密度总和（ROI光密度=ROI面积×ROI光密度平均值）。用分析得到的ROI荧光总和值来表示斑马鱼肝脏类雌激素物质的含量。

11. 结果评价

（1）数据分析

将图像分析得到的数值进行统计学分析，计算各组试验的平均值（Mean）及标准误差（Standard Error, SE），统计学处理结果用Mean ± SE表示。与平均值相差2个SD以上的数据可以按照异常数据予以剔除，每组数据最多只能剔除2个异常数据。剔除掉异常数据之后，采用统计分析软件进行统计学分析。宜采用方差分析，按方差分析的程序先进行正态性检验（P值）和方差齐性检验（F值）。当 $F < 0.05$ ， $P < 0.05$ 时，各组均数间组间至少有一组有显著性差异，宜采用非参数检验。当 $F \geq 0.05$ ， $P \geq 0.05$ 时，采用单因素方差分析，选择事后两两比较的结果进行统计。对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计。若变量转换后仍未达到正态或方差齐性的目的，改用秩和检验进行统计。样品处理组与溶剂对照组相比较， $P < 0.05$ 表明统计学上有显著性差异。

（2）结果判定及说明

受试样品各浓度组与溶剂对照组比较，任一浓度组肝脏荧光强度总和升高，差异有显著性，可判定该受试样品具有雌激素效应。

注1：由于受试样品在标准稀释水中的溶解度受限，可能导致结果判定为不具有雌激素效应。

注2：由于斑马鱼毒性敏感性，导致受试样品浓度设置受限，可能导致结果判定为不具有雌激素效应。

12. 保证试验有效性的条件

根据前期积累的大量试验数据，当且仅当一个试验满足如下的质量控制要求时，试验结果的有效性才会被认可：

（1）正常对照组（如果使用了助溶剂，也包括溶剂对照组）斑马鱼的死亡率或异常率不得超过10%，超过10%则该次试验视为失败。

（2）正式试验中，如果使用了助溶剂，溶剂对照组与正常对照组之间不能存在统计学上的显著性差异，如果溶剂对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异，则该次试验视为无效。

（3）正式试验中，阳性对照组与正常对照组之间存在统计学上的显著性差异，否则该次试验结果视为无效。

六、主要试验验证情况和预期达到的效果

1. 样品前处理方法 液相色谱-串联质谱法验证

1.1 样品信息

爱他美 2段奶粉，生产厂家Milupa GmbH。

乙腈中8种甾体激素混标溶液（GB 31658.9-2021&农业农村部公告第282号-1-2020）和乙腈中8种甾体激素内标混标溶液（GB 31658.9-2021内标&农业农村部公告第282号-1-2020）具体信息见表1。

表1. 混标和内标信息汇总

混标	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	内标	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	生产厂家
雌三醇	100	雌三醇-D3	10	天津阿尔塔科技有限公司
雌酮	100	雌酮-D2	10	
炔雌醇	100	炔雌醇-D4	10	
17 α -雌二醇	100	17 α -雌二醇-D2	10	
雌二醇	100	雌二醇-D2	10	
(E,Z)-己烯雌酚	100	E-己烯雌酚-D8	10	
己烷雌酚	100	己烷雌酚-D4 (非对映异构体混合物)	10	
双烯雌酚	100	Z,Z-双烯雌酚-D6	10	

1.2 验证时间、单位及人员

表2. 验证时间、单位及人员

验证时间	验证单位	验证人员
2023.11-2024.01	浙江省食品药品鉴定研究院	梁晶晶、赵超群

1.3 验证方法

1.3.1 提取

- (1) 取 10g 奶粉置于 50 mL 离心管中，共 4 管；
- (2) 分别向每个离心管中加入 15 mL 超纯水，涡旋 1min,混匀，（水浴锅预热至 35~40°C）超声 5 min 之后分别在每个离心管中加入 22.5 mL 乙腈，涡旋 1 min，混匀，超声 5 min；
- (3) 分别向每个离心管中加入 6.0 g 氯化钠，涡旋 1min,混匀 1000 rpm，离心 10 min，将离心完的上清液装入离心管中；
- (4) 将含有上清液的离心管，放置到氮吹仪中，氮吹至干燥，加入 4mL 甲醇复溶，随后将液体移入装有 300 mg C18 的 5 mL 离心管，涡旋 30 s，于 4000 rpm，离心 1min，取净化过的上清液过 0.22 μm 滤膜，进行过滤，收集液体。

1.3.2 仪器参考条件

条件参考《GB 31658.9-2021 食品安全国家标准 动物性食品及尿液中雌激素类药物多残留的测定 液相色谱—串联质谱法》和《农业农村部公告第 282 号-1-2020 饲料中炔雌醇等 8 种雌激素类药物的测定 液相

色谱-串联质谱法》。

1.4 验证试验结果

8种内分泌干扰加标回收结果显示平均回收率在87.730~106.275%，精密度在1.616~7.852%，表明该方法适用于奶粉的前处理。

2. 样品内分泌干扰物效应 转基因斑马鱼法验证

2.1 样品信息

在标准文本确定后，本标准提出单位与各参与单位协商，确定了共计4种内分泌干扰物阳性化合物和2种内分泌干扰物阴性化合物，这些化合物是否具有内分泌干扰物效应均有文献报道，用于对本标准所述试验方法的测试和验证。样品详细信息见表3。

表3. 样品信息汇总

样品编号	样品名称	样品批号	性状	生产厂家
1	雌二醇	H1901075	白色晶状粉末	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
2	4-叔辛基苯酚	H2106184	白色絮状物	上海麦克林生化科技股份有限公司
3	双酚A	C2126102	白色颗粒	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
4	炔雌醇	E2014109	白色粉末	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
5	11-酮睾酮	C12730415	白色粉末	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
6	地塞米松	C2110208	白色粉末	上海阿拉丁生化科技股份有限公司

2.2 验证时间、单位及人员

除本标准提出单位杭州环特生物科技股份有限公司之外，另有两家从事斑马鱼生物技术的公司参与本标准试验方法的验证工作。验证单位和人员的详细信息见表4。

表4. 验证时间、单位及人员

验证时间	验证单位	验证人员
2023.02-2023.04	杭州环特生物科技股份有限公司	杨怡雯、徐懿乔
2023.04-2023.07	宁波海关技术中心	刘汉伟
2022.10-2022.12	南京歆佳医药科技有限公司	周锦锦

2.3 验证方法

按《内分泌干扰物检测 转基因斑马鱼法》标准文本进行测试及验证。

2.4 验证试验结果

本标准规定的试验方法的测试结果受多种因素的影响，如样品处理方式、斑马鱼胚胎的质量状况、拍照技术、定量方法等。因此，为了验证方法的一致性，我们组织了协同验证试验，由三具有斑马鱼试验能力的实验室单位，在相同的试验条件下对同一样品进行测试，以测试结果的重复性反映方法的一致性。

标准提出单位杭州环特生物科技股份有限公司、验证单位1宁波海关技术中心、验证单位2南京歆佳医药科技股份有限公司分别按照本标准文本中的方法对表1中所列的全部6种样品进行内分泌干扰物效应评价。3家验证单位的试验结果表明，上述4种内分泌干扰物阳性化合物（雌二醇、4-叔辛基苯酚、双酚A和炔雌醇）在斑马鱼评价试验中均呈阳性反应，2种内分泌干扰物阴性化合物（11-酮睾酮和地塞米松）均呈阴性反应。

三家验证单位用同样的方法测试同一个样品，结果显示不同实验室之间斑马鱼内分泌干扰物阳性化合物和阴性化合物含量非常接近，测试结果的相对标准偏差达到20%以内，说明不同实验室之间的重复性较好。

七、采用国际标准和国外先进标准情况及与国际同类标准水平的对比说明

本标准没有采用国际标准。

本标准制定过程中查到同类国际标准：OECD TG250 EASZY assay: Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embryos.

八、标准中涉及专利的情况

本标准中未涉及到技术方法的专利保护。

九、预期达到的效果

内分泌干扰物是科学界和国际社会高度关注的一大类新污染物,对生态安全和人体健康存在已知的和潜在的危害。世界卫生组织和国际化学品安全规划(WHO/IPCS)将内分泌干扰物定义为能改变内分泌系统的功能并对生物体或子代造成不良影响的外源物质。2021年我国明确将内分泌干扰物列为需要加强治理的新污染物。本标准的实施有利于政府监管部门管控内分泌干扰物的使用，规范市场竞争，打击非法添加生产行为，倒逼企业进一步提高生产质量水平，压缩违法生产企业市场生存空间，维护健康的市场秩序，为人民食品安全保驾护航。减少内分泌干扰物的摄入将减少免疫系统、生殖系统、神经系统的疾病发生、发展，造福子孙后代。

十、与现行法律、法规、强制性标准的关系

本标准的编制依据为现行的法律、法规和国家标准，与这些文件中的规定相一致。

十一、重大分歧意见的处理经过和依据

在本标准的编写过程中，无重大意见分歧。

十二、参考文献

- [1] 孙沛雯, 王中卫, 李翔宇, 等. 不同水体中环境类雌激素污染状况调查与分析[J]. 干旱环境监测, 2020,34(1):44-48.
- [2] Du B, Fan G, Yu W, et al. Occurrence and risk assessment of steroid estrogens in environmental water samples: A five-year worldwide perspective[J]. Environ Pollut, 2020,267:115405.
- [3] Adeel M, Song X, Wang Y, et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review[J]. Environ Int, 2017,99:107-119. Yilmaz B, Terekeci H, Sandal S, et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention[J]. Rev Endocr Metab Disord, 2020,21(1):127-147.
- [4] 罗书. 全自动固相萃取-高效液相色谱法测定养殖场废水中 6 种常见环境雌激素的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2019,55(4):380-382.
- [5] 刘小红, 邓华, 常林, 等. 环境雌激素 SERS 检测的研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2020,40(10):3038-3047.
- [6] 耿玉慧, 沙隽伊, 王文静, 等. 核酸适配体在环境雌激素检测领域的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019,40(13):207-215.
- [7] Wangmo C, Jarque S, Hilscherova K, et al. In vitro assessment of sex steroids and related compounds in water and sediments - a critical review[J]. Environ Sci Process Impacts, 2018,20(2):270-287.
- [8] Gorelick DA, Pinto CL, Hao R, et al. Use of Reporter Genes to Analyze Estrogen Response: The Transgenic Zebrafish Model[J]. Methods Mol Biol, 2016,1366:315-325.
- [9] Gorelick DA, Halpern ME. Visualization of estrogen receptor transcriptional activation in zebrafish[J]. Endocrinology, 2011,152(7):2690-2703.
- [10] Lee O, Takesono A, Tada M, et al. Biosensor zebrafish provide new insights into potential health effects of environmental estrogens[J]. Environ Health Perspect, 2012,120(7):990-996.
- [11] Kawakami K, Asakawa K, Hibi M, et al. Gal4 Driver Transgenic Zebrafish: Powerful Tools to Study Developmental Biology, Organogenesis, and Neuroscience[J]. Adv Genet, 2016,95:65-87.
- [12] Kawakami K, Asakawa K, Muto A, et al. Tol2-mediated transgenesis, gene trapping, enhancer trapping, and Gal4-UAS system[J]. Methods Cell Biol, 2016,135:19-37.