

酶水解—高效液相色谱法测定人血清中双酚 A

吴同俊, 郑力行, 吴强恩, 周志俊*

(复旦大学公共卫生学院, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-荧光 (HPLC-FL) 法检测人血清中的双酚 A。方法 采用 β -葡萄糖酸酐酶水解人血清中的结合型双酚 A, 乙醚-正己烷 (1:1) 混合溶液提取人血清中的双酚 A, C_{18} 色谱柱分离, 以己腈-四氢呋喃-水 (40:3:60) 的混合溶液为流动相, 激发光波长 227 nm, 发射光波长 310 nm 检测人血清中的双酚 A。结果 双酚 A 在 20 min 内完全洗脱出来, 分离效果良好。在 0~2 500 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内, 双酚 A 的质量浓度与峰面积成良好的线性关系, 其在血清中的检测限为 0.139 $\mu\text{g/L}$ 。加标回收率大于 83.5%, 精密度为 1.13%~5.26%。结论 该法灵敏度高、重复性好, 能够有效地分离和检测人血清中的双酚 A, 适用于人血清中双酚 A 的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 双酚 A; 人血清; 酶解

中图分类号: R115; R446 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0070-04

Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography after enzyme hydrolysis

WU Tong-jun, ZHENG Li-xing, WU Qiang-en, ZHOU Zhi-jun*

(School of Public Health, Fudan University; Ministry of Education Key Laboratory for Public Health Safety, Shanghai 200032, China)

Abstract; Objective To establish a simple and highly sensitive HPLC method for determining bisphenol A in human serum.

Method β -glucuronidase was used to hydrolyze bisphenol A in human serum samples, then the bisphenol A was extracted by a mixed solvent of *n*-hexane and diethyl ether (1:1), dried by nitrogen flow and dissolved with the mixture of acetonitrile and water (40:3:60); the operating condition including C_{18} column, acetonitrile-tetrahydrofuran-water (40:3:60) mixture as mobile phase, a flow rate of 1 ml/min and fluorescence detector with 227 nm excitation wavelength and 310 nm emission wavelength. **Result** A complete elution of bisphenol A could be achieved in 20 minutes using the method mentioned above, and there was a good linear relationship between the concentrations of bisphenol A and their peak areas in the range of 0~2 500 $\mu\text{g/L}$. The detection limit in human serum was 0.139 $\mu\text{g/L}$, the absolute recovery of bisphenol A in human serum was not less than 83.5%, and the inter-day precision was in the range of 1.13% to 5.26%. **Conclusion** The results showed that the method is pretty good both at sensitivity and repetition, which is reliable and suitable for the determination of bisphenol A in human serum.

Key words: High-performance liquid chromatography; Bisphenol A; Human serum; Enzyme hydrolysis

双酚 A (bisphenol A, BPA), 化学名 2,2-双(4-羟基苯基)丙烷, 是重要的化工原料, 广泛应用于日常生活中。人群通过食品及日常生活接触到双酚 A 的机会非常普遍。很多研究表明, 双酚 A 是在动物实验中确认的一种激素样活性物质 (hormonally active agent)。动物实验发现双酚 A 可增加雄性小鼠前列腺重量、减少每日精子生成量、加速雌性小鼠青春期生长速度、促使阴道口早期开放等^[1,2]。胎儿期的暴露还可引起雌性动物生殖器官的发育异常; 发育中的脑组织可能是双酚 A 的一个重要靶器官^[3]。体外的重组酵母细胞系统 (recombinant yeast system) 实验表明, 双酚 A 的雌激素活性约为雌二醇活性的 1/10 000, 同

时具有强的抗雄激素活性^[4]。因此, 双酚 A 对人的潜在危害也受到了广泛关注。血清中双酚 A 的测定方法已有文献报道, 但主要集中在血清中游离型的双酚 A, 包括气相-质谱法 (GC-MS)、液相-质谱法 (LC-MS)、高效液相-紫外法 (HPLC-UV)、电化学法 (HPLC-ED) 和荧光法 (HPLC-FL)^[5,6], 而对于结合型的双酚 A 则很少有报道。我们采用高灵敏度的 HPLC-FL 法, 采用简单易行、易于普及的液-液萃取法直接对血清中双酚 A 进行测定, 分离效果良好, 回收率高, 较好地满足了实际分析的需要。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪, 配有荧光检测器和二极管阵列式检测器, 并配备 3D 化学工作站, SB-2200 型超声波清洗仪 (上海必能信超声有限公司), XW-80 漩涡混匀器 (原上海医科大学仪器厂)。所用玻璃仪器洗净烘干, 避免接触任何可能的污染。

收稿日期: 2005-06-13; 修回日期: 2005-07-30

作者简介: 吴同俊 (1978-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 卫生毒理学。

*: 通讯作者, 教授, 博士生导师。

双酚 A 标准品 (上海化学试剂一厂), 己腈、四氢呋喃 (色谱纯, Dikma 公司), 乙醚、正己烷、甲醇均为分析醇, 乙醚和正己烷经浓缩确认在没有双酚 A 的情况下使用, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 为 5.0), β -葡萄糖酸酐酶 (Sigma 公司), 实验用水均为亚沸重蒸水。其他试剂均为分析纯。

准确称取 0.1 g 双酚 A 标准品, 用己腈溶解于 100 ml 的容量瓶中, 配成浓度为 1 mg/ml 的标准储备液, 于 4 °C 冰箱保存, 临用时用 40% 的己腈稀释为 10 μ g/ml 的双酚 A 标准应用液。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 Inertsil ODS-3 4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m 色谱柱; 流动相为乙腈 : 四氢呋喃 : 水 (40 : 3 : 60); 检测波长: 激发波长 227 nm, 发射波长 310 nm; 流速 1 ml/min, 柱温 40 °C, 整个色谱过程为 25 min, 进样 20 μ l, 外标法定量。

1.2.2 标准工作曲线 取 0.5 ml 不含双酚 A 的混合血清, 分别加入一定量的双酚 A, 使其浓度分别为 0、2、10、50、100 和 250 μ g/L, 按照 1.2.3 项的样品处理方法, 用 40% 的己腈 50 μ l 充分融解, 以 1.2.1 的色谱条件进行检测。以出峰时间定性、峰面积定量。以峰面积 (Y) 对标准品浓度 (X) 进行线性回归, 得双酚 A 的标准工作曲线。

1.2.3 样品的处理 取血样后, 37 °C 水浴 1 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至少 0.5 ml 于 1.5 ml 洁净的玻璃冻存管中, 于 -80 °C 下超低温保存。测定前, 血清在室温下缓缓解冻, 取 0.5 ml 置于 5 ml 的具塞玻璃试管中 (已用乙醇清洗), 向其中加入 pH 5.0 的 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 100 μ l, 再加入 20 μ l 的 β -葡萄糖酸酐酶, 混匀, 37 °C 水浴 3 h, 取出冷却至室温, 向其中加入 3 ml 乙醚-正己烷 (1:1) 混合液萃取, 旋涡混匀 2 min, 取出上层有机层于另一洁净的玻璃试管。再向其中加入 2 ml 的上述混合萃取液, 混旋, 取出有机层。合并两次萃取的有机层, 置于 40 °C 水浴中用氮气吹干, 40% 己腈 50 μ l 充分融解进样。

2 结果

2.1 标准工作曲线及回归方程

按照 1.2.1 与 1.2.3 的方法, 测得双酚 A 的标准品峰及血清样品峰 (见图 1, 2), 双酚 A 的出峰时间为 14.2 min, 在 0~2 500 g/L 范围内, 其线性良好, 标准工作曲线回归方程为 $Y=0.3996 X+2.287$, $r=0.9999$ 。

2.2 精密度

取 3 份空白血样, 分别向其中加入一定量的双酚 A, 使其在血清中的浓度分别为 2、10、50 μ g/L。按上述

样品处理方法, 于同一天内进样 6 次, 计算天内精密度, 其相对标准偏差在 1.13%~5.26%, 见表 1。

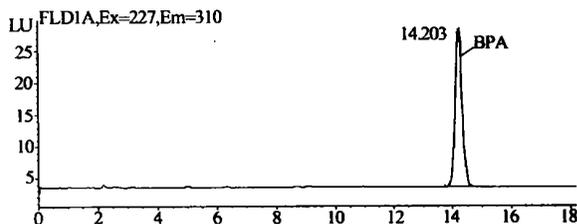


图 1 双酚 A 标准品峰

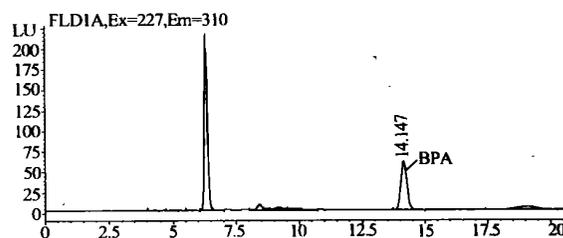


图 2 双酚 A 样品峰

表 1 方法精密度实验结果 (n=6) μ g/L

浓度	平均测定浓度	标准差	变异系数 (%)
2	1.629	0.0857	5.26
10	9.553	0.1083	1.13
50	48.696	0.8277	1.70

2.3 回收率

取 4 份空白血样, 分别向其中加入一定量的双酚 A, 使其浓度分别为 10、50、100、250 μ g/L。按 1.2.3 的样品处理方法进样, 计算其绝对回收率, 由表 2 可以看出, 即使是在 2 μ g/L 的情况下, 双酚 A 的绝对回收率仍然在 80% 以上。

表 2 方法的准确度实验结果 μ g/L

加标浓度	实验测得浓度	绝对回收率 (%)
2	1.76	83.70
10	10.06	97.71
50	49.70	97.51
100	100.45	98.82
250	250.85	98.70

2.4 方法的检测限

按照 EPA 推荐的方法^[7], 在空白样品中加入一定量的双酚 A, 使其浓度估计为方法最低检测限的 5 倍, 按照优化的样品处理方法进样 7 次, 依标准曲线求出相应的检测浓度, 计算标准差, 按下式计算其检测限: $MDL=t_{(n-1, \alpha=0.99)}(s)$

式中: n 为实际进样次数, $t_{(n-1, \alpha=0.99)}$ 值为 3.143; s 为计算标准差。

按上述方法求得双酚 A 的检测限为 $0.139 \mu\text{g/L}$ 。

2.5 应用

我们用此法对 14 份血清 (3 份大鼠染毒血清, 4 份普通人群, 7 份职业人群) 分别做了检测, 结果显示该实验条件能够很好地分离血清中的双酚 A, 具体结果见表 3。

表 3 血清样品中测得的双酚 A 值 $\mu\text{g/L}$

人群	检出浓度范围	均值
普通人群	0	0
暴露工人	17.5~164.7	81.4
大鼠染毒血清	58.2~707.6	227.3

3 讨论

3.1 检测方法的选择

代谢性研究已经表明, 双酚 A 在体内迅速代谢成葡萄糖醛酸结合物, 血清中的双酚 A 主要以双酚 A 葡萄糖醛酸的形式存在, 仅有小部分的游离双酚 A, 血清中游离双酚 A 的比例随代谢时间、种属、性别不同而差异明显, 雄性大鼠体内游离双酚 A 的比例约为 4.6% ^[8]。而人体实验发现, 经口摄入的双酚 A 几乎全部以结合的形式存在^[9]。研究表明, 普通人群体内游离的双酚 A 浓度男性为 $1.49 \mu\text{g/L}$, 女性 $0.64 \mu\text{g/L}$ ^[10]。我们以往测得的职业人群游离双酚 A 的浓度范围为 $30.6 \mu\text{g/L}$, 目前尚无结合型双酚 A 的人群测定资料, 因此, 游离双酚 A 及结合双酚 A 的检测对评价双酚 A 的危险度具有重要的意义^[9]。目前已报道 Yashuda 等用 HPLC 库仑电量法测定大鼠血清中结合型的双酚 A^[11], Völkel 等用 LC-MS 法测定人血清中的双酚 A^[9], 但这些方法或者灵敏度不高, 或者样品处理复杂, 仪器要求高。本方法检测限达到了 $0.139 \mu\text{g/L}$, 明显优于 Yashuda 的 $15 \mu\text{g/L}$, 仪器要求低于 Völkel 使用的方法, 样品处理简单, 能够很好地满足大批量分析的要求。

3.2 检测条件的优化

参照文献报道^[12, 13], 本实验选择 40% 的己腈水溶液为流动相, 结果表明, 该流动相不适用于液-液萃取法, 一部分样品的双酚 A 峰不能完全分开。根据以往的经验, 我们在上述流动相中加入 0.01% 的三氟乙酸, 但并没有达到理想的分离效果。在 40% 的己腈中加入 2.5% 的四氢呋喃^[14], 其分离效果仍然不太理想; 在加大四氢呋喃的用量, 将其含量由 2.5% 增加到 5% 后, 色谱峰分离良好。实验发现, 四氢呋喃的量保持在 3%~5% 的情况下均能达到良好的分离效果。从实验的实际费用方面考虑, 我们选

择上述的流动相配比。文献报道的波长选择各异, 激发光波长为 227~275 nm, 发射光波长主要集中在 300 nm 附近^[6, 12], 通过本次实验发现, 激发光波长在 227 nm 时的荧光效率约为 275 nm 的 2.5 倍, 同时在该条件下, 分析的基线稳定, 其他杂质出峰面积较少。因此, 选择激发光波长为 227 nm、发射光波长为 310 nm 较为适宜。由于仪器配备了紫外检测器, 故同时以紫外检测器对可疑测量值加以确认, 紫外的检测波长为 226 nm^[14]。荧光与紫外的面积比约为 6:1。

3.3 样品处理方法的优化

目前大多数文献报道的提取方法主要为固相萃取法^[5], 但这种方法费用昂贵, 不适用于一般的常规检测。也有个别采用液相萃取法, 但萃取的效率不高。我们采用优化的液相萃取法, 萃取效率较高, 绝对回收率达 97% 以上, 可满足实际分析的需要。在样品提取过程中, 我们比较了乙醚与乙醚-正己烷混合溶液的萃取效果^[13, 15], 发现混合溶剂的萃取效率明显高于单纯乙醚, 萃取出的样品较干净, 杂质峰较少。有文献报道, 用乙酸缓冲液调整血浆的 pH 值, 以满足实验酶解的条件及后续的提取需要^[15]。但实验中发现, 该缓冲液容易使血浆蛋白变性, 形成胶冻状固体, 不宜后面的提取工作。本次研究还采用了柠檬酸缓冲液, 发现它对后续的萃取影响较大, 萃取率波动大。相比之下, 磷酸缓冲液能够很好地满足实际样品的水解、提取的需要。实验中还发现萃取液的量一般应大于 3 ml, 这样不易形成凝胶, 2 次萃取的效率高于一次萃取。

参考文献:

- [1] Takaia Y, Tsutsumia BO, Ikezuki Y. Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development [J]. *Reprod Toxicol*, 2001, 15: 71-74.
- [2] Honmaa S, Suzukib CA, David L. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction [J]. *Reprod Toxicol*, 2002, 16: 117-122.
- [3] Caroline M, Beverly SM, Ana MR et al. Endocrine disruptors: from wingspread to environmental developmental biology [J]. *J Steroid Biochem*, 2003, 83: 235-244.
- [4] Sohni P, Sumpster JP. Several environmental oestrogens are also anti-androgens [J]. *J Endocrinol*, 1998, 158: 327-339.
- [5] Yoshimura Y, Brock JW, Makino T, et al. Measurement of bisphenol A in human serum by gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 458: 331-336.
- [6] Inoue K, Kato K, Yoshimura Y. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B*, 2000, 749: 17-23.
- [7] EPA. EPA revised assessment of detection and quantitation approaches [EB/OL]. <http://www.epa.gov/waterscience/methods/det/rad/rad.pdf>, 2004, EPA-821-B-04-005.

[8] Kurebayashi H, Betsui H, Ohno Y. Disposition of a low dose of 14C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 73 (1): 17-25.

[9] Völkel W, Colnot T, Csarady GA, et al. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration [J]. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15 (10): 1281-1287.

[10] Takeuchi T, Tsutsumi O. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291 (1): 76-78.

[11] Yashuda S, Wu PS, Hattori E, et al. Simultaneous detection of isoflavones and bisphenol A in rat serum by high-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68 (1): 51-58.

[12] Zhao MP, Liu Y, Li YZ. Development and characterization of an immunoaffinity column for the selective extraction of bisphenol A from serum samples [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 783: 401-410.

[13] 郑力行, 石峻岭, 周志俊. 高效液相色谱法测定血清中的双酚 A [J]. *中华预防医学杂志*, 2003, 37 (6): 450-451.

[14] Yang M, Kim SY, Lee SM, et al. Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2003, 44: 546-551.

[15] 肖全伟, 黎源倩, 张浩, 等. 高效液相色谱法测定大鼠血清中 4-羟基酚和双酚 A [J]. *四川大学学报 (医学版)*, 2004, 35 (2): 271-275.

· 尘毒防治 ·

某铅冶炼厂职业病危害控制措施效果调查

臧家明¹, 邹玲琪¹, 孙积刚¹, 马雪松²

(1. 大连市疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116021; 2. 大连市第四人民医院, 辽宁 大连 116001)

为进一步改善某铅冶炼厂的作业环境, 根据国家有关职业卫生的标准、规范, 对该厂职业病危害防护措施运行情况进行调查。现报道如下。

1 调查结果

该厂为外商独资企业, 于 2002 年 9 月竣工并开始试生产。距市区 44 km, 厂区三面环山, 距最近的村落约 1 500 m。现有员工 107 人, 其中男性 99 人, 女性 8 人。

该企业的产品主要是生产铅合金铸锭。所采用的原料是由韩国进口的矿粉, 含铅量达 90% 以上。在熔炼厂房南侧墙壁上部虽然安装有 4 台轴流风机, 但通风效果不佳, 熔炼过程中产生多种职业病危害, 尤其以铅烟、铅尘危害为重。在投料、鼓风、搅拌时, 炉口敞开, 大量的铅烟排出, 污染整个车间的空气。电解车间有电解槽、阳极锅、阴极锅, 进入电解车间的半成品含铅量很高, 经过加热有大量铅烟挥发, 污染车间的环境, 危害作业工人的身体健康。车间空气中粉尘和铅尘、铅烟浓度的测定结果见表 1。

该厂作业环境噪声主要是来自阳极炉、阴极炉、熔铅炉和烧结炉的风机, 噪声强度 65~83 dB (A), 均未超过国家卫生标准限值。

该厂接铅作业工人的尿铅和血铅均值明显高于正常参考值, 并检出 3 例铅吸收。

2 问题与建议

通过本次调查可以看出该厂职业卫生方面存在的问题:

- (1) 电解车间与熔炼车间在同一厂房内, 生产时车间内烟尘弥漫造成了交叉污染, 致使电解车间和熔炼车间作业场所空气中的铅烟 (尘) 浓度超过国家规定的最高容许浓度, 超标率为 100%。
- (2) 铸造极板的阳极锅、阴极锅、电解槽、铅锭的熔铅锅及其浇铸口未设置局部排风和净化装置。
- (3) 熔铅

表 1 车间空气中粉尘和铅尘、铅烟浓度测定结果 (n=8)

采样地点	职业病危害因素	平均浓度 (mg/m ³)
锅炉房	煤尘	4.0
熔炼车间阳极炉	煤尘	4.0
熔炼车间阴极炉	煤尘	3.4
熔炼车间阳极锅	铅烟	0.038
熔炼车间阴极锅	铅烟	0.036
熔炼车间鼓风机出铅口	铅烟	0.041
熔炼车间鼓风机上料口	铅尘	0.062
电解车间七列电解槽	铅烟	0.245
电解车间八列电解槽	铅烟	0.090
电解车间九列电解槽	铅烟	0.077
电解车间清渣	铅尘	0.210
烧结车间烧结炉	铅烟	0.035

注: 煤尘的时间加权平均容许浓度为 4 mg/m³, 短时间接触容许浓度为 6 mg/m³; 铅烟的最高容许浓度为 0.03 mg/m³, 铅尘为 0.05 mg/m³。

后的浮渣和电解泥无固定的地点和容器存放。(4) 工人穿着工作服进出生产车间与生活区。休息、吃饭时洗手不彻底, 现场作业工人的尿铅、血铅明显升高, 提示作业场所存在较明显的铅危害。

建议该厂: (1) 将电解车间与熔炼车间分开, 不宜在同一厂房内混岗生产。(2) 在铅污染严重的岗位应设置有效的局部排风和净化装置, 做到定期维修、检查, 使作业场所空气中的铅烟 (尘) 降至国家规定的限值以下。(3) 加强职业卫生的管理, 工人上岗操作时必须佩带有效的劳保护具 (防毒防尘面具、口罩、手套等), 增强自我保护意识, 养成良好的卫生习惯, 预防铅吸收。