

· 监测与检验 ·

高效液相色谱法测定大鼠血清和肝脏中壬基酚方法的改良

The method for determination of nonylphenol in SD rats serum and liver by HPLC

罗娅¹, 俞捷¹, 杨雪松¹, 王攀², 杨雪峰³, 宁伟伟³, 李克彬¹, 许洁¹

(1. 遵义医学院公共卫生学院; 2. 遵义医学院附属医院核医学科; 3. 遵义医学院附属医院胃肠外科, 贵州 遵义 563099)

摘要: 均以正己烷与乙醚(体积比7:3)为提取剂, 用C₁₈色谱柱分离, 乙腈-乙酸(0.1%)为流动相, 柱温40℃, 在激发波长275 nm、发射波长312 nm用FLD检测器检测大鼠血清和组织中壬基酚(NP)含量。结果显示标本中NP含量与峰面积成良好的线性关系, 线性范围9~12 000 ng/ml, 检出限3.84 ng/ml, 加标回收率85.7%~99.5%, 日内精密度为0.34%~1.21%, 日间精密度0.91%~1.82%, 均<2%。说明本方法更简便、准确、灵敏, 回收率高。

关键词: 壬基酚; 血清; 肝脏; 高效液相色谱法

中图分类号: O625.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2015)04-0284-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2015.04.018

壬基酚(nonylphenol, NP)是一种环境内分泌干扰物, 化学结构与雌二醇相似, 以拟雌激素作用干扰机体内分泌代谢。目前测定环境水样、塑料和土壤中NP的方法主要有气质联用(GC-MS)、液质联用(LC-MS)和高效液相色谱荧光检测法(HPLC-FLD)^[1-3]。以往的方法存在流动相易堵塞仪器、检测效率低等缺陷, 所以本研究对高效液相色谱法(HPLC)进行改良优化, 以提高检测效率。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

HP-1100型液相色谱仪(美国Agilent公司), 色谱柱: Eclipse XD8-C18、150 mm×4.6 mm、5 μm(美国Agilent公司), 电子分析天平(上海精科天平仪器厂), DK-98-II数显水浴恒温水浴锅(天津泰斯特), TDL-S离心机(上海安亭), QL-901旋涡混合器(海门其林贝尔), FLUKO手持式匀浆机(德国), 制冰机(雪科)。正己烷、乙醚(分析纯, 天津科密欧), 乙腈(色谱纯, Dikma Technologies INC. USA), 冰乙酸(色谱纯, 天津科密欧), 纯净水(怡宝), NP标准(Fluka), NP灌胃试剂(西亚), 玉米油(鲁花)。

1.2 实验动物

清洁级成年雄性SD大鼠60只, 体重约200 g, 购于第三

军医大学动物中心, 动物合格证号: SCXK(渝)2012-0005。饲养条件: 室温22℃, 自由饮水、进食, 5 d换垫料1次。

1.3 色谱条件

流动相为乙腈与0.1%冰乙酸(体积比85:15), 进样量10 μl, 柱温40℃, 流速1.0 ml/min, FLD检测器, 激发波长275 nm, 发射波长312 nm。

1.4 标准曲线绘制

精确称取NP标准品, 用乙腈溶解稀释成9、45、90、450、900、1800、3600、12000 ng/ml, 分别进样10 μl, 测定峰面积, 以峰面积(Y)对标准浓度(X)绘制标准曲线, 得出回归方程。

1.5 动物染毒及标本采集

雌雄SD大鼠分笼饲养1周, 按雌雄比(2:1)合笼, 将受孕母鼠随机分为4组: 低、中、高剂量染毒组(染毒壬基酚50、100、200 mg/kg)和对照组(玉米油), 从受孕第6~20天灌胃染毒上述剂量壬基酚, 仔鼠出生后, 10%水合氯醛麻醉下处死, 摘取母鼠眼球取血, 3000 r/min离心10 min, 吸取上清液-20℃冻存; 解剖母鼠取肝脏, 冻存于-20℃待检测。

1.6 样品NP的提取

1.6.1 血清NP的提取 取血清样品0.5 ml, 加正己烷-乙醚提取剂(体积比7:3)4 ml, 置旋涡混合器混匀30 s, 静置15 min, 取上清液于50℃水浴蒸干, 加0.5 ml乙腈溶解后移至进样瓶上机检测。

1.6.2 组织NP的提取 称取母鼠和仔鼠肝脏约0.5 g, 置于具塞玻璃离心管内, 加入正己烷-乙醚提取剂(体积比7:3)4 ml, 用手持式匀浆机20 000 r/min匀浆5~10 s, 4000 r/min离心10 min, 取上清液于50℃水浴蒸干, 加0.5 ml乙腈溶解后移至进样瓶上机检测。

2 结果

2.1 实验条件选择

2.1.1 激发波长和发射波长的选择 根据比较, NP在荧光检测器上的吸收值高于其在紫外检测器上的吸收值, 因此采取前者灵敏度较高。通过二极管阵列在线扫描, 发现NP标准在激发波长275 nm、发射波长312 nm时基线平稳, 且灵敏度最高。

2.1.2 流动相的选择 乙腈的洗脱能力较甲醇强, 分离效果好, 基线稳定。有文献报道^[4,5], 因NP具有弱酸性, 在流动相中加入乙酸-乙酸铵缓冲液后容易沉积, 导致仪器堵塞, 对色谱柱损害较大。经试验, 在流动相中加入0.1%冰乙酸制造酸性环境, 使NP以分子形式存在, 分离效果很好。调整乙腈

收稿日期: 2015-04-07

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 201381360439); 贵州省教育厅青年基金(黔教合KY字[2013]198); 贵州省卫生厅基金(gzkwj20131127); 贵州省科技厅自然科学基金(黔科合J字[2014]2177号; [2014]2185号); 贵州省科技厅遵义医学院联合基金(2014); 遵义市15851人才基金

作者简介: 罗娅(1983—), 女, 实验师, 主要从事预防医学与卫生学研究。

通讯作者: 许洁, 女, 博士, 教授, E-mail: xujie360@sina.com。

与冰乙酸的体积比为 90 : 10、85 : 15、80 : 20, 发现体积比为 85 : 15 时, 出峰时间适当, 分离效果好, 峰型对称, 峰保留时间最短, 所以选择以乙腈与 0.1% 冰乙酸体积比 85 : 15 为流动相。见表 1。

表 1 HLPC 测定 NP 流动相比比例的选择

乙腈-乙酸(0.1%) (体积比)	保留时间 (min)	峰面积	峰宽 (min)	对称 因子
90 : 10	2.26	24.50	0.19	1.072
85 : 15	3.95	85.62	0.15	0.985
80 : 20	4.90	90.14	0.22	0.857

2.1.3 柱温的选择 调整柱温为 25℃、30℃、35℃、40℃, 测量同一标准溶液, 比较峰形、面积、峰宽, 发现柱温 40℃ 时分离效果最好, 保留时间减少, 峰面积最大, 所以确定 40℃ 为检测温度。见表 2。在上述优化的色谱条件下测得 NP 标准溶液、大鼠血清和肝脏组织中 NP 的图谱 (见图 1)。

表 2 HLPC 测定 NP 柱温的选择

柱温(℃)	保留时间(min)	峰面积	峰宽(min)	对称因子
25	4.49	356.70	0.19	1.072
30	4.42	380.23	0.15	0.985
35	4.19	90.14	0.22	0.857
40	3.98	96.45	0.22	0.878

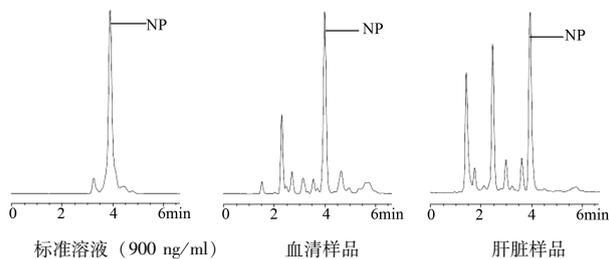


图 1 NP 标准溶液、大鼠血清和肝脏中 NP 的高效液相色谱图

2.2 NP 提取条件优化

2.2.1 血清样品中 NP 的提取 取同一大鼠血清 3 ml, 分成 6 份, 每份 0.5 ml, 分别加入正己烷 2 ml、3 ml、4 ml, 正己烷与乙醚混合液 2 ml、3 ml、4 ml, 按 1.6.1 步骤提取上机, 在加入 3 ml 正己烷与乙醚混合液时, 所得到的峰面积最大, 因此选择此方法。

2.2.2 肝脏中 NP 的提取 取同一大鼠肝脏, 剪碎分成 6 份, 每份 0.5 g, 编号为 1~6, 1 号加 2 ml 生理盐水匀浆后再加 2 ml 正己烷与乙醚混合液, 2 号直接加 4 ml 提取剂, 3 号加 4 ml 乙酸乙酯作为提取剂, 4~6 号分别加正己烷与乙醚混合液 3 ml、4 ml、5 ml, 其余步骤同 1.6.2。经检测, 5 号峰面积最大, 因此选择正己烷乙醚混合液作为提取剂, 0.5 g 肝脏样品中加 4 ml 最适宜。

2.3 方法性能指标的考察

2.3.1 标准曲线和检出限 将配制的标准溶液在优化色谱条

件下测定, 标准曲线 $y = 0.1726x \pm 0.2664$ ($R^2 = 0.999$), 以 3 倍基线噪声所对应的待测物的质量浓度为方法的检测限, 检测限为 3.84 ng/ml。

2.3.2 方法的精密度的选择 选择 3.84 ng/ml、192 ng/ml、4800 ng/ml 3 个浓度的标准溶液, 每天检测 3 次, 连续 6 d, 测得的峰面积标准偏差在 1.3%~3.2% 之间。见表 3。

表 3 HLPC 测定 NP 精密度的选择 (n=6) ng/ml

浓度 (ng/ml)	日内精密度的选择		日间精密度的选择	
	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)	$\bar{x} \pm s$	RSD(%)
3.84	3.84±0.08	1.21	3.91±0.02	1.82
192.00	192.0±0.26	0.93	195.0±1.1	1.15
4800	4800.0±2.9	0.34	4817.0±4.4	0.91

2.3.3 方法的准确度的选择 取同一样品分成 3 份, 经样品预处理后上机测得本底值, 然后加不同浓度的标准溶液, 测得加标后浓度, 计算回收率, 血清 NP 加标回收率在 90.6%~99.5% 之间, 肝脏 NP 的加标回收率在 85.7~96.3% 之间。见表 4。

表 4 HLPC 测定大鼠血清和组织中 NP 的加标回收率

标本	样品浓度 (ng/ml)	加标值 (ng/ml)	测定值 (ng/ml)	回收率 (%)
血清	4 012	1 800	5 288	91.0
		3 600	6 894	90.6
		12 000	16 046	99.5
肝脏组织	8 725	1 800	9 015	85.7
		3 600	11 097	90.0
		12 000	19 953	96.3

3 小结

本实验采用的实验材料均为玻璃制品, 避免了塑料中 NP 的污染, 所有玻璃材料均用重铬酸钾-硫酸洗液浸泡过夜, 充分清洗后再用纯水冲洗, 使用前用正己烷淋洗。本方法优化了血清和肝脏中 NP 的提取和液相色谱的检测, 简便易操作、准确、灵敏, 检出限低, 检测效率高, 特别是从样品中 NP 的提取到流动相的选择, 避免使用缓冲盐, 而选择了弱酸, 不仅分离效果好, 且对液相色谱仪起到了很好的保护作用。

参考文献:

- [1] 社会芳. 环境内分泌干扰物检测与分析方法研究进展 [J]. 卫生研究, 2005, 34 (4): 493-494.
- [2] 周鸿, 张晓健, 胡建英. 饮用水中壬基酚及其前体物的分布特性 [J]. 环境与健康杂志, 2004, 21 (5): 288-290.
- [3] 范奇元, 李卫华, 金泰虞. 壬基酚在大鼠组织中的清除与分布 [J]. 卫生毒理学杂志, 2011, 15 (1): 42-43.
- [4] 曹燕花, 张霞, 王茜, 等. 雌性大鼠血清和组织中壬基酚的高效液相色谱测定法 [J]. 环境与健康杂志, 2010, 27 (2): 138-140.
- [5] 乔丽丽, 郑力行, 蔡德培. 性早熟女童血清中双酚 A、辛基酚、4-壬基酚测定和分析 [J]. 卫生研究, 2010, 39 (1): 9-12.