

高效液相色谱-化学发光法测定人血清及动物组织中的己烯雌酚

李 冉, 章竹君*, 付爱华, 李云云, 张建锋

(陕西师范大学 陕西省生命分析化学重点实验室, 西安 710062)

摘 要: 基于己烯雌酚在酸性介质中对 Ce (IV) 和 Rh6G 的化学发光体系的增敏作用, 建立了人血清及动物组织中己烯雌酚的高效液相色谱/化学发光检测方法。色谱柱为 Welchrom-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水(75:25, V/V, pH6.0)。己烯雌酚在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 2.5 \times 10^{-6}$ g/mL 范围内呈良好线性, 在优化的实验条件下最低检出限为 3.0×10^{-9} g/mL。对 5.0×10^{-7} g/mL 的己烯雌酚进行 11 次平行测定, 其相对标准偏差为 2.1%。

关键词: 高效液相色谱; 化学发光; 己烯雌酚

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2012)08-023-04

己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES) 是一种人工合成的雌激素类物质, 具有酚羟基结构, 属于二苯乙烯类。其药理和治疗作用与天然雌二醇相同, 主要用来治疗雌激素不足和体内激素失调引起的功能性出血、闭经等疾病。同时 DES 也是一种有效的促蛋白合成类固醇, 可以促进动物增重, 增加蛋白质沉积和减少脂肪沉积。因此在许多国家, 被用作生长素添加于可食用动物的饲料中, 以促进动物生长, 提高瘦肉率。然而早在二十世纪七十年代, 就有研究者发现 DES 的使用可诱发阴道癌, 并与月经失调、宫外孕、早产及不育症的发生有关, 而长期食用含 DES 残留的动物肉食品, 会对食用者的生理带来不良影响, 如致癌, 对肝肾的损害, 导致儿童发育异常和体内激素的失调等。我国严格控制 DES 的使用, 国家标准(GB/T5009.108-2003) 中禽畜组织己烯雌酚残留量的测定方法为高效液相色谱法^[1], 其检出限为 0.25 mg/kg。

对 DES 残留的检测方法有酶联免疫测定法(ELISA)^[2], 高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)^[3], 气相色谱法(GC)^[4]等。测定己烯雌酚的化学发光法有较高的灵敏度^[5-7], 但选择性差, 不能直

接用于复杂生物样品中 DES 的检测。本文建立的己烯雌酚高效液相色谱-化学发光检测法, 将人血清及动物组织样品经简单处理后用高效液相色谱进行分离, 化学发光法柱后检测, 解决了化学发光选择性差的问题。此法较国标法的灵敏度高 40 倍。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

LC-6A 高效液相色谱仪(Shimadzu, 日本); 7125 型手动进样阀(20 μL-loop Contati, CA 美国); IFFM-D 型流动注射化学发光分析仪(西安瑞迈)。

硫酸铈储备液(上海国药集团化学试剂公司): 用 3 mol/L 的 H₂SO₄ 配制成 0.1 mol/L 的硫酸铈储备液; 罗丹明 6G 储备液(上海国药集团化学试剂公司): 用二次水配制成 5.0×10^{-3} mol/L 的储备液; 己烯雌酚(中国药品生物制品检定所, 含量 99.9%): 用甲醇: 水(75:25, V/V, pH 6.0) 溶液配制成储备液。试剂均为分析纯, 水为二次水, 甲醇为色谱纯。

1.2 色谱条件

色谱柱: Welchrom-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(75:25, V/V, pH6.0); 流

收稿日期: 2011-01-07; 修订日期: 2011-02-25

基金项目: 中央高校基础研究基金项目(GK20091004) 资助

作者简介: 李 冉(1986 -), 女, 硕士研究生; E-mail: liran_huajiao@163.com

速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μ L。

1.3 生物样品处理

血清的处理: 取血清 0.5 mL, 加入 0.5 mL 的甲醇, 用涡旋振荡器振荡 1 min, 在超速离心机中离心 10 min, 取上清液进样。动物组织的处理: 将样品捣碎, 准确称取 5 g 浸泡于 10 mL 的甲醇溶液中, 超声半小时后, 用匀浆管匀浆半小时, 在超速离心机中离心 10 min, 取上清液进样。

1.4 实验装置

如图 1 所示。

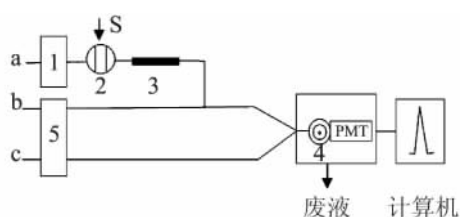


图 1 实验装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the flow system for the determination of diethylstilbestrol

a - 流动相; b - 罗丹明 6G; c - 硫酸钾; 1 - 高压泵; 2 - 进样阀; 3 - 色谱柱; 4 - 流通池; 5 - 恒流泵; S - 样品溶液; PMT - 光电倍增管

1.5 实验方法

如图 1 所示, 打开高效液相色谱仪和化学发光仪, 等基线稳定后, 取己烯雌酚标准溶液或生物样品溶液 20 μ L 进样, 记录化学发光的发光强度信号, 以相对峰高定量测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相 己烯雌酚能溶于甲醇、乙腈和氯仿中。采用高效液相色谱分离己烯雌酚的流动相有: 甲醇-磷酸盐缓冲溶液, 甲醇-水溶液, 乙腈-三乙胺缓冲溶液, 乙腈-磷酸盐缓冲溶液等。经多次试验, 选用甲醇-水作为流动相时化学发光基线比较稳定, 而且有更好的分离度。流动相的流速不同, 色谱柱的柱效和色谱峰的展宽也不同, 综合考虑灵敏度和分离度, 本文选用的流动相流速为 1.0 mL/min。

2.1.2 甲醇对化学发光信号的影响 实验发现, 流动相中的甲醇比例由小变大时, 发光强度增强, 保留时间变短。综合考虑灵敏度和分离效果, 选用甲醇-水 (75:25, V/V, pH6.0) 作为流动相。

2.2 化学发光反应条件的选择

2.2.1 罗丹明 6G 的浓度 在 $1.0 \times 10^{-5} \sim 1.0 \times 10^{-3}$ mol/L 的浓度范围考察了罗丹明 6G 对化学发光信号的影响。结果表明, 罗丹明的浓度为 1.2×10^{-4} mol/L 时, 化学发光信号最强。

2.2.2 H_2SO_4 的浓度 对浓度在 0.5 ~ 4.0 mol/L 的范围内的 H_2SO_4 进行了实验, 发现在浓度为 3.0 mol/L 时, 化学发光信号最强, 超过上述浓度时发光信号减弱。

2.2.3 硫酸钾的浓度 硫酸钾作为氧化剂, 其浓度的大小直接影响化学发光信号的强弱。在 $1.0 \times 10^{-3} \sim 2.0 \times 10^{-2}$ mol/L 的范围内, 发现硫酸钾浓度在 8.0×10^{-3} mol/L 时, 化学发光强度最大, 超过上述浓度时发光信号减弱。

2.2.4 试剂流速 罗丹明 6G 和硫酸钾的流速直接影响着化学发光信号的强度, 流速太慢或太快, 可能会导致检测不到发光信号或信号强度微弱。经试验发现, 流速为 2.5 mL/min 时, 己烯雌酚的发光信号最强。

2.3 校准曲线、精密度、检出限

在选定的上述条件下, 分别对人血清、鸡肉、猪肉进行了试验分析, 己烯雌酚在 $1.0 \times 10^{-8} \sim 2.5 \times 10^{-6}$ g/mL 范围内与化学发光强度呈良好线性。其回归方程为 $\Delta I = 345.73\rho + 9.91$ (ΔI : 相对发光强度 ρ : μ g/mL) $r = 0.9995$; 对 5.0×10^{-7} g/mL 的己烯雌酚进行 11 次平行测定, 其相对标准偏差为 2.1%。根据 IUPAC 建议, 计算得出生物样品中己烯雌酚的最低检出限为 3.0×10^{-9} g/mL (3σ)。

2.4 生物样品的色谱分离情况

图 2(a) ~ (d) 分别为己烯雌酚标准色谱图, 人血清、鸡肉和猪肉的添加标准样品的色谱图。实验证明, 己烯雌酚的保留时间约为 7.11 min, 能与样品中的杂质峰达到良好的分离。

2.5 生物样品分析

按照上述 1.3 中的方法分别处理血清和鸡肉、猪肉, 分别取 20 μ L 的上清液进行测定, 通过工作曲线得出生物样品中己烯雌酚的含量。为证明实验方法的可靠性, 以空白动物组织进行了标准加入回收试验, 其结果见表 1。由表 1 看出, 方法的回收率在 89.6% ~ 105.0% 之间, 每种样品均测 3 次, 相对标准偏差在 2.1% ~ 3.4% 之间, 均 < 5.0%, 符合国内外法规的要求。

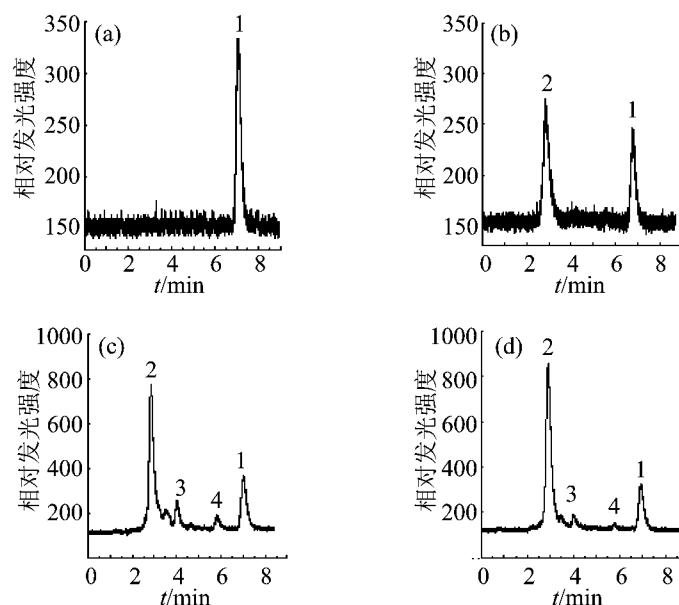


图 2 己烯雌酚色谱图

Fig. 2 The chromatograms of diethylstilbestrol

a - 己烯雌酚标准液; b - 血清加标溶液; c - 鸡肉加标溶液; d - 猪肉加标溶液; 1 - 己烯雌酚; 2, 3, 4 - 杂质峰

表 1 样品分析结果

Tab. 1 Analytical results of samples

样品编号	原始量	加入量	测得量	回收率/%	RSD/%
血清 1 ($\mu\text{g/mL}$)	0	0.67	0.60	89.6	3.4
血清 2 ($\mu\text{g/mL}$)	0	1.33	1.32	99.2	2.1
鸡肉 1 (mg/kg)	0	0.20	0.21	105.0	2.2
鸡肉 2 (mg/kg)	0	0.40	0.39	97.5	2.5
猪肉 1 (mg/kg)	0	0.20	0.18	90.0	3.0
猪肉 2 (mg/kg)	0	0.40	0.41	103.0	2.8

参考文献

- [1] GB/T 5009.108-2003 畜禽肉中己烯雌酚的测定
 [2] Wajih N. Sawaya, Khalid P. Lone, Adnan Husain, et al. Food Chem, 1998, 63(4): 563
 [3] Antoni Rúbies, Albert Cabrera, Francesc Centrich. J AOAC Int, 2007, 90(2): 626
 [4] Fuh M R, Huang S Y, Tzeun Yean Lin. Talanta, 2004, 64: 408
 [5] 罗丽荣, 周福林, 章竹君. 分析实验室, 2006, 25(4): 79
 [6] Zhang Q L, Li J, Ma T T, et al. Food Chem, 2008, 111: 498
 [7] Liao S L, Wu X P, Xie Z H. Anal Chim Acta, 2005, 537: 189

Determination of diethylstilbestrol in human serum and animal tissues by HPLC separation with chemiluminescence detection

LI Ran, ZHANG Zhu-jun*, FU Ai-hua, LI Yun-yun and ZHANG Jian-feng (Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science of Shaan xi Province, Shaan xi Normal University, Xi'an 710062), Fenxi Shiyanshi, 2012, 31(8): 23~26

Abstract: Based on the enhanced sensitivity of the cerium(IV)-rhodamine 6G chemiluminescence system by

diethylstilbestrol, a method for the determination of diethylstilbestrol in human serum and animal tissues by HPLC separation coupled with chemiluminescence (CL) detection was described. The separation was carried out on a Welchrom-C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with mobile phase consisting of methanol-H₂O (75:25, V/V, pH6.0). Under the optimum conditions, the CL intensity has a linear relationship with the concentration of naproxen in the range of $1.0 \times 10^{-8} \sim 2.5 \times 10^{-6}$ g/mL with the detection limit of 3.0×10^{-9} g/mL (3σ). The relative standard deviation for 5.0×10^{-7} g/mL diethylstilbestrol was 2.1% (n = 11).

Keywords: High performance liquid chromatography; Chemiluminescence; Diethylstilbestrol

2012 中国功能材料科技与产业高层论坛 征文通知(第一轮)

2012 中国功能材料科技与产业高层论坛拟于 2012 年 10 月召开。论坛将以高端学术报告、官产学研高峰论坛等为主要交流手段,通过主题报告、研究报告、论文简报、专题通报、墙报等方式组织交流活动,并出版学术论文集。届时将邀请功能材料学界、业界院士、863 专家、973 专家、长江学者、杰青获得者、著名学者、知名企业家等出席会议并作特邀报告。会议召开前将编辑出版《2012 中国功能材料科技与产业高层论坛论文集》。现将《论文集》征文事宜通知如下:

征文对象

国内外功能材料领域的专家、学者、科研人员、年轻学子等。

征文范围

近年来,在功能材料领域科学研究、技术创新、产业振兴及实际应用中所取得的创新成果和重要进展、关于国内外功能材料各分支前沿的当前态势、最新进展的综合评述。其内容涉及环境友好材料与新能源材料;力、热、声、光、电功能材料;生物、纳米、传感、智能材料及其前沿交叉与应用;薄膜、功能膜、稀土、金属、陶瓷、电磁波防护材料;军工与空间、海洋等开发用材料及其应用与产业化;功能材料检测与评价技术。

征文要求

- (1) 会议只受理没有在国内正式刊物和学术会议上发表过的原始论文、创新论文和研究报告。
- (2) 来稿应主题明确,观点鲜明,行文流畅,并不涉及保密内容。
- (3) 应征论文需有完整的英文标题、摘要、关键词、作者信息、参考文献等,文章主体部分英文或中文均可。论文格式请见附件要求排版。研究报告的字数不超过 5000 字,综合评述不超过 8000 字。来稿请注明论文联系人的详细联系方式,包括固定电话、手机、传真、电子信箱等。
- (4) 论文文稿请用电子邮件方式发至学会秘书处邮箱(ybelxh@vip.sina.com)。电子稿要求是 Word 格式录入(来稿请注明"会议征文"字样)。
- (5) 在相同情况下,会议将优先考虑录用已确定参会人员的论文。
- (6) 应征论文经专家审查合格后,将编入《论文集》,并酌收编校费。
- (7) 所有会议录用的论文,将交由专门出版机构出版《会议论文集》,并将报送国际权威检索机构 ISI (Institute for Scientific Information) 审核,供 CPCI-S (科技会议录引文索引) 检索收录。
- (8) 第一批论文收稿截止日期:2012 年 5 月 30 日。第二批论文收稿截止日期:2012 年 8 月 20 日。

联系方式

地 址: 重庆仪表材料研究所学会秘书

邮 编: 400700

电 话: 023-68264719 89850186

传 真: 023-68264719

网 址: <http://www.chinafm.org.cn>

E-Mail: ybelxh@vip.sina.com

联系人: 卢利平 龙 斌