

鱼体内环境激素 DMP 和 DEP 的检测方法

李明揆, 葛建, 林芳, 戴贤君

(中国计量学院 生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

摘要:建立同时检测鲫(*Carassus auratus* Linnaeus)血浆和肌肉中邻苯二甲酸二甲酯(DMP)和邻苯二甲酸二乙酯(DEP)的高效液相色谱方法,进行初步的代谢动力学研究。血浆样品经液-液萃取,肌肉样品经液-液萃取和固相小柱处理后,以乙腈:水=40:60(V/V)为流动相,流速1.0 mL/min,采用SHIMADZU ODS柱(150 mm×4.6 mm; i. d., 5 μm)色谱柱分离。测定鲫经口染毒后血浆和肌肉中DMP和DEP的浓度。结果表明,标准曲线线性范围为0.05~10.0 μg/mL,线性关系良好($r > 0.99$),定量限为0.05 μg/mL,回收率95%以上,日内变异系数和日间变异系数均低于15%。经口染毒48 h内,鲫血浆和肌肉中均能检测到DMP和DEP的残留。该法操作简便、快速、灵敏、准确,已经初步用于鲫血浆和肌肉中DMP和DEP的代谢动力学和残留研究。

关键词:鲫;邻苯二甲酸二甲酯;邻苯二甲酸二乙酯;高效液相色谱法

中图分类号:Q493.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2010)02-0116-05

环境激素(Environmental Hormone, EH)为一类重要环境污染物,已经成为继臭氧层破坏、全球气候变暖之后的第三大环境问题,被喻为威胁人类存亡的定时炸弹(Sonja Lorenz, 2003)。邻苯二甲酸酯类(Phthalic Acid Esters, 简称PAEs, 别名酞酸酯)是一类重要的有机化合物,主要用于塑料改性添加剂、农药、涂料、印染、化妆品、油漆和香料的生产,在自然界中被检测普遍存在(吴平谷等, 1999; 林兴桃等, 2004; 陈珠灵等, 2007; 杨琼等, 2008)。近年来研究发现,PAEs类化合物具有雌激素样活性,已经将PAEs归类于环境激素(又称环境荷尔蒙或内分泌干扰物),它能对生物的正常行为及生殖、发育相关的正常激素的合成、贮存、分泌、体内输送,结合以及清除等过程产生障碍。因此,PAEs类化合物在环境中的富集、迁移势必成为动物和人类的潜在威胁(Makoto et al, 2000; Foster et al, 2000; Veronica et al, 2004; Meeuwen et al, 2007)。

美国国家环保局(EPA)已经将包括邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)在内的6种PAEs类列入129种重点控制的污染物名单中,我国优先污染物黑名单中也列出了包括DMP在内的3种PAEs类化合物(金相灿等, 1990)。这些

PAEs化合物进入水环境中将会被鱼类等水生动物所富集,不但可引起鱼类繁殖障碍,而且随着食物链的迁移必将对人类产生重要影响。本研究建立了DMP和DEP在鲫(*Carassus auratus* Linnaeus)血浆和肌肉中HPLC-UV同时检测方法,为PAEs类化合物在鱼体内代谢动力学和残留研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验用健康鲫的体重为(250±20)g。试验前在1.0 m×0.5 m×0.5 m水族箱中暂养7 d,试验水温10~12℃。试验期间,按体重的1%投喂不含任何抗生素的全价鱼饲料,空气增养机充氧,每天换水1次。

1.2 药品与试剂

邻苯二甲酸二甲酯和邻苯二甲酸二乙酯标准品(纯度99%以上)购自上海百灵威化学品有限公司;试验用甲醇、乙腈为HPLC级,购自杭州华东医药有限公司;乙酸乙酯、正己烷为分析纯,杭州华东医药股份有限公司提供。

1.3 色谱分析方法

日本岛津shimadzu 20AT高效液相色谱系统,浙江大学智达N2000色谱工作站,色谱柱为SHIMADZU ODS C₁₈ column(5 μm, 150 mm×4.6 mm),保护柱ODS C₁₈ precolumn(4.6 mm×12.5 mm),流动相为乙腈:水=40:60(V/V),流速1.0 mL/min,柱温30℃,紫外检测波长235 nm。

收稿日期:2009-06-11

基金项目:浙江省自然科学基金资助课题(Y3080255)。

通讯作者:葛建,1979年生,男,博士, E-mail: gejian16888@163.com

作者简介:李明揆,1987年生,女,河南郑州人,在读硕士研究生。 E-mail: limingkuiyaoxue@yahoo.com.cn

1.4 样品的处理与制备

1.4.1 血浆样品处理 准确吸取 0.4 mL 血浆以及 0.2 mL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 内标液白术内酯 III 于 10 mL 具塞离心管中,漩涡混匀 1 min,向其中准确加入乙酸乙酯 3 mL,振荡器漩涡 5 min,6 000 r/min 高速离心 5 min,取出全部上层有机相;2 mL 乙酸乙酯重复萃取 1 次,合并 2 次萃取的有机相于尖底玻璃离心管中,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气流吹干,残渣用 0.1 mL 流动相复溶,漩涡混匀 1 min,18 000 r/min 离心 5 min 后,吸取上清液 20 μL 进高效液相色谱系统分析。

1.4.2 肌肉样品处理 准确称取 0.4 g 鲫肌肉于 10 mL 具塞离心管中,向其中加入 0.2 mL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 白术内酯 III,漩涡混匀 1 min,准确加入乙酸乙酯 3 mL,振荡器漩涡 5 min,超声 5 min,6 000 r/min 高速离心 5 min,取出全部上层有机相;2 mL 乙酸乙酯重复萃取 1 次,合并 2 次萃取的有机相于尖底玻璃离心管中,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气流吹干,残渣用 0.1 mL 正己烷复溶,然后转入硅藻土小柱净化,柱底填充脱脂棉,装入 1 g 硅藻土,上端填 1 cm 厚无水 Na_2SO_4 。先用 10 mL 正己烷洗脱,再以 6 mL 的丙酮-正己烷(1: 4, V/V) 混合液洗脱,收集洗脱液,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气流吹干,残渣用 0.1 mL 流动相溶解,漩涡混匀 1 min,18 000 r/min 离心 5 min 后,吸取上清液 20 μL 进高效液相色谱系统分析。

1.5 标准曲线制备

DMP、DEP 和内标物标准品溶解于甲醇溶液中,将储备液分别稀释成 10.0、5.0、1.0、0.5、0.1、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 系列标准液,向 6 支具塞离心管中各加入 0.4 mL DMP 和 DEP 标准液,将离心管于 45 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气流吹干,再向上述每个离心管中各加入 0.2 mL (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 内标液和 0.4 mL (g) 空白血浆(肌肉),按照 1.4 样品处理方法处理后进样分析,以药物与内标物峰面积比值(Y)为纵坐标,以质量浓度(X)为横坐标作标准曲线,求出标准曲线方程和相关系数(r)。

1.6 回收率及精密密度

在标准曲线范围内选择高、中、低浓度血浆(肌肉)样品 0.05、0.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为质控样品(QC),按照 1.4 样品处理方法,每个浓度样品重复 5 次,以样品中药物和内标峰面积比值与直接溶于流动相下两者峰面积比值之比,计算高、中、低 3 种浓度下的回收率。比较以上样品于日内 5 次和日间 5 次测定的峰面积的变化幅度,计算精密密度。

1.7 分析方法的应用

采用一端光滑且有一定硬度的细塑料管,缓慢插入鲫前肠,按 50 mg/kg (DMP 和 DEP 溶解于植物油中,配制 25 mg/mL 液体,按 2 mL/kg 经口染毒) 灌入,无回吐者保留试验。于染毒后不同时间点,自尾静脉采血于肝素化离心管中,离心后取出 0.4 mL 血浆;同时采集背部肌肉,每个时间点采样 5 尾,每尾采样 1 次。将血浆和肌肉样品按照 1.4 样品处理方法处理后进样分析,进样后将测得的 DMP 和 DEP 与内标峰面积之比代入标准曲线方程中,计算样品中 DMP 和 DEP 浓度。

2 结果与讨论

2.1 色谱图及特异性分析

在选定的色谱分析条件下,DMP 和 DEP 及内标物分离良好,通过比较空白血浆(肌肉)样品、空白血浆(肌肉)添加样品以及染毒后血浆(肌肉)样品的色谱图,结果表明,在药物和内标相应保留时间处均无干扰峰出现,其保留时间分别为 7.932 min 和 19.165 min(图 1)。

2.2 色谱分析条件的优化

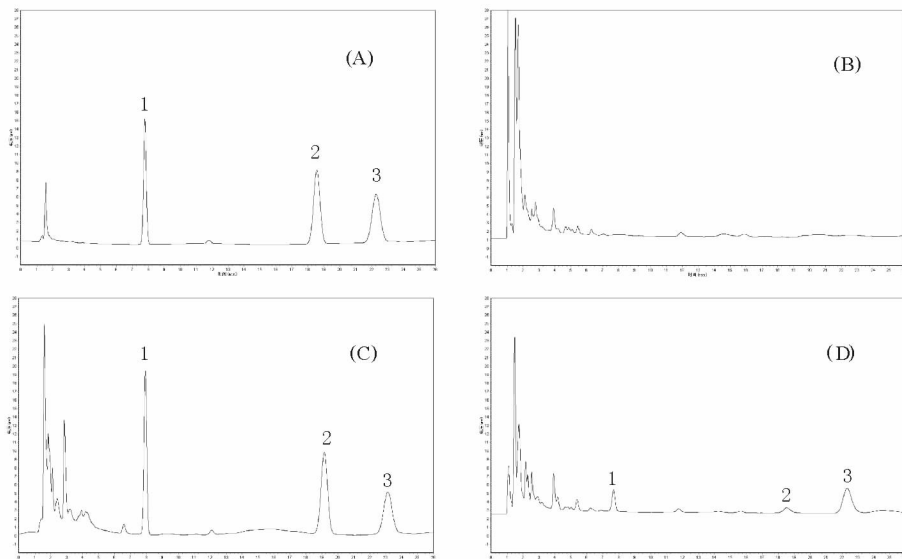
本研究曾分别考察了乙腈: 水 = 50: 50 和乙腈: 水 = 30: 70 作为流动相,结果发现,当采用乙腈: 水 = 50: 50 作为流动相组分时,虽然 DMP 和 DEP 及内标均能很好的分离,但 DMP 出峰时间较早,易于被血浆或肌肉中杂质干扰。当采用乙腈: 水 = 30: 70 作为流动相组分时,虽然 DMP 和 DEP 及内标也能很好的分离,但 DEP 和内标的峰形较宽,检测限灵敏度较低。最终发现采用乙腈: 水 = 40: 60 作为分离流动相较理想。

在样品萃取过程中曾尝试过甲醇、乙腈、乙醚、二氯甲烷、三氯甲烷及乙酸乙酯等萃取剂,结果发现,采用乙酸乙酯作为萃取溶剂较理想,因此本试验最终选择了乙酸乙酯作为萃取剂。当处理肌肉样品时,采用直接萃取后进样,发现杂质峰较多,而且基线非常不稳,因此,我们采用了自制的固相小柱对样品进行了净化,结果非常理想。

在检测 DMP、DEP 等 PAEs 类化合物时,有采用 220 nm 作为检测波长的报道,虽然 DMP 和 DEP 波长在该波长下吸收峰较大,但是此时组织提取液中内源性杂质在此波长下吸收也较强,已经把 DMP 和 DEP 的色谱峰所掩蔽,干扰 DMP 和 DEP 的分析。当采用 235 nm 作为生物样品中 DMP 和 DEP 的检测分析波长,经过试验发现,在此波长下血浆和肌肉中杂质干扰较小,因此本试验最终选用了 235 nm 作

为最佳检测波长,而且在此波长下 DMP 和 DEP 吸

收较好,内源性杂质干扰少,满足了试验要求。



(A) 标准液色谱图(5 µg/mL);(B)空白血浆色谱图;(C)空白血浆加样色谱图(5 µg/mL);
(D)给药后8h血浆药物色谱图;峰1:DMP;峰2:DEP;峰3:内标。

图1 血浆中DMP和DEP及内标的色谱图

(A) Titer chromatogram (5 µg/mL); (B) chromatogram of blank plasma; (C) Chromatogram of sampled blank plasma (5 µg/mL);
(D) Plasma drug level chromatogram 8 hr after providing drug; Peak value 1: DMP; Peak value 2: DEP; Peak value: internal standard.

Fig. 1 Internal standard chromatogram of DMP and DEP in plasma

2.3 标准曲线

在本试验提取方法和色谱条件下,在0.05 ~ 10.0 µg/mL浓度范围内,线性关系良好,利用线性回归方法计算出斜率、截距以及相关系数。标准曲线方程及相关系数见表1。

2.4 回收率和精密度

在给定的提取方法和检测条件下($n=5$),DMP和DEP在血浆和肌肉中的回收率达95%以上,日内和日间变异系数均小于15%,说明DMP和DEP在鲫鱼血浆和肌肉中回收率和精密度均符合检测要求(表2)。

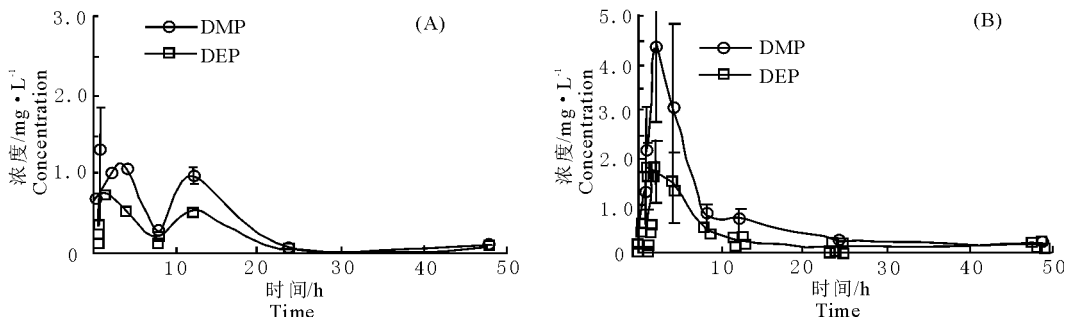
2.5 分析方法的应用

将分析所得血浆和肌肉样品中DMP和DEP与内标峰面积之比代入相应的方程求出鲫鱼血浆和肌肉中浓度,绘制出组织浓度-时间曲线(图2)。

表1 鲫鱼血浆和肌肉中DMP与DEP方程及相关系数

Tab. 1 Equation and correlation coefficient of DMP and DEP in plasma and muscle of Crucian carp

药物	血浆	肌肉
DMP	$Y=0.2552X-0.0038$	$Y=0.1495X+0.0039$
	$r=0.9998$	$r=0.9998$
DEP	$Y=0.2752X+0.0092$	$Y=0.3407X+0.0264$
	$r=0.9997$	$r=0.9996$



(A)为血浆中代谢动力学曲线;(B)为肌肉中残留消除曲线。

图2 DMP和DEP在鲫鱼血浆和肌肉中浓度-时间曲线

(A) Metabolism dynamic curve in plasma of Crucian carp; (B) Remnant elimination curve in muscle of Crucian carp.

Fig. 2 Concentration-duration curve of DMP and DEP in plasma and muscle of Crucian carp

研究表明,经口染毒后48 h,鲫体内均能检测到DMP和DEP存在,表明该分析方法能够满足PAEs类环境激素在鱼体内的代谢动力学和残留研究。

表2 鲫血浆中DMP和DEP回收率及精密度

Tab.2 Recovery and precision of DMP and DEP in plasma of Crucian carp

药物	添加浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	回收率/ %	变异系数/%	
			日内	日间
DMP	0.05	96.42 ± 8.57	7.67	8.89
	0.5	96.31 ± 9.15	6.28	9.49
	5.0	95.36 ± 8.27	5.38	8.67
DEP	0.05	100.61 ± 9.13	5.49	9.08
	0.5	108.87 ± 10.81	3.67	9.93
	5.0	96.23 ± 5.28	3.46	5.43

3 结论

本研究建立了一种鲫血浆和肌肉中DMP和DEP简便、快速、灵敏、准确的高效液相色谱(HPLC)检测方法,并将此应用鲫体内DMP和DEP的代谢动力学研究和残留检测。结果表明,该分析方法能够满足鲫体内DMP和DEP的代谢及残留消除研究;同时,试验中自制的固相小柱价格低廉、制作简便及重复性好,具有一定的推广应用价值。

参考文献:

- 陈珠灵,黄瑜奎,王桂美,等. 2007. 化妆品中邻苯二甲酸酯类环境激素检测方法研究[J]. 环境科学与技术,30(4):43-47.
- 金相灿等编. 1990. 有机化合物污染化学-有毒有机物污染

- 化学[M]. 北京:清华大学出版社:266-275.
- 林兴桃,陈明,王小逸,等. 2004. 污水处理厂中邻苯二甲酸酯类PAEs分析[J]. 环境科学与技术,27(6):79-83.
- 吴平谷,韩关根,王惠华,等. 1999. 饮用水中邻苯二甲酸酯类的调查[J]. 环境与健康杂志,16(6):338-339.
- 杨琼,张明时,陈文生,等. 2008. 气相色谱法测定食用油脂中6种邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 中国粮油学报,23(5):171-174.
- J A van Meeuwen, Wter Burg, A H Piersma, et al. 2007. Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells[J]. Food and Chemical Toxicology, 45(11):2 319-2 330.
- Makoto Ema, Emiko Miyawaki, Kunio Kawashima. 2000. Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats[J]. Reproductive Toxicology, 14(1):13-19.
- P M D Foster, R C Cattley, E Mylchreest. 2000. Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat; implications for human risk assessment [J]. Food and Chemical Toxicology, 38(1):97-99.
- Sonja Lorenz. E. U. 2003. Shift Endocrine Disrupter Research Into Overdrive[J]. Science, 16:1069.
- Veronica Salazar, Carmen Castillo, Carmen Ariznavarreta, et al. 2004. Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring[J]. Toxicology, 205(1-2):131-137.

(责任编辑 万月华)

Simultaneous Determination of Dimethyl Phthalate (DMP) and Diethyl Phthalate (DEP) in Plasma and Muscle of Crucian carp (*Carassuys auratus*)

LI Ming-kui, GE Jian, LIN Fang, DAI Xian-jun

(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou Zhejiang 310018, China)

Abstract: To develop an HPLC-UV method for simultaneous determination of dimethyl phthalate (DMP) and diethyl phthalate (DEP) in Crucian carp plasma and muscle. Then the metabolic kinetics was primarily studied. After a simple liquid-liquid extraction and SPE treatment, DMP, DEP and the internal standard were separated on SHIMADZU C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) and detected by UV spectrometry. The detection wavelength was set at 235 nm. The mobile phase consisted of acetonitrile-water (40: 60) at a flow rate of 1.0 mL/min. The concentration of DMP and DEP in crucian carp plasma and muscle was determined after oral administration by the method above. The linear calibration curves were obtained in the concentration range of 0.05 ~ 10.0 μg/mL ($r > 0.99$). The lowest limit of quantification was 0.05 μg/mL. The recoveries were more than 95% in plasma, and the intra- and inter-day coefficients of variation were less than 15% in all cases. The concentrations of DMP and DEP could be detected at 48 h after oral administration. The RP-HPLC method was specific, simple, sensitive and accurate for the determination of DMP and DEP in crucian carp plasma and muscle. The RP-HPLC method was primarily applied to the metabolic kinetics study of DMP and DEP in Crucian carp after oral administration.

Key words: Crucian carp (*Carassuys auratus* Linnaeus); Dimethyl phthalate (DMP); Diethyl phthalate (DEP); HPLC-UV