



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103901143 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201410171617. X

(22) 申请日 2014. 04. 28

(73) 专利权人 中国环境科学研究院

地址 100012 北京市朝阳区安外大羊坊 8 号
2 号楼中段 433 室

(72) 发明人 于云江 王琼 孙朋 向明灯
李良忠

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 任重

(51) Int. Cl.

G01N 30/14(2006. 01)

G01N 30/88(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101701261 A, 2010. 05. 05,

CN 102279229 A, 2011. 12. 14,

CN 103675110 A, 2014. 03. 26,

CN 102998395 A, 2013. 03. 27,

张秀尧 等. 亲水液相色谱三重四极杆质谱联用法快速检测尿液和血浆中河豚毒素. 《分析化学》. 2009, 第 37 卷 (第 12 期),

Wei Zeng et al.. Determination of sitagliptinin human plasma using protein precipitation and tandem mass spectrometry. 《Journal of Chromatography B》. 2010, 第 878 卷 (第 12 期),

肖忠新 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱及气相色谱-质谱法测定人血清中的 3 种溴系阻燃剂. 《色谱》. 2011, 第 29 卷 (第 12 期),

何松洁 等. 凝胶渗透色谱柱去脂-气相色谱-质谱法测定人血清中新型卤系阻燃剂. 《分析化学》. 2012, 第 40 卷 (第 10 期),

审查员 黎作佳

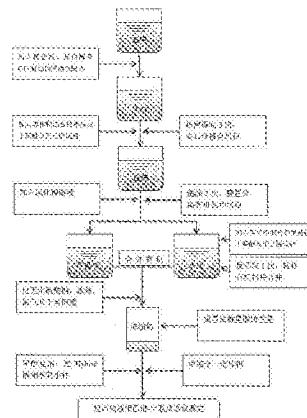
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种用于少量生物血清中四溴双酚 A 分析的前处理方法

(57) 摘要

一种用于少量生物血清中四溴双酚 A 分析的前处理方法, 涉及生物样品中有机污染物的检测分析技术, 可为血清中四溴双酚 A 含量的测定提供前处理技术。样品加入等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂, 经细胞超声破碎仪超声提取血清中四溴双酚 A, 再用氯化钾溶液洗涤、无水硫酸钠干燥后, 将提取液浓缩至恒重测定脂肪重量, 样品复溶后经含氧化锆颗粒的 Hybrid 固相萃取小柱去除脂类杂质。样品经超高效液相色谱-串联质谱仪检测表明方法所需血清量较少, 净化效果好, 除脂效果优异, 操作简单, 回收率较高。该发明可以有效提取净化少量生物血清样品中四溴双酚 A, 为四溴双酚 A 环境与健康研究提供基础方法。



CN 103901143 B

1. 一种用于少量生物血清中四溴双酚 A 分析的前处理方法,其特征在于:该方法包括如下步骤,

- (1) 准确移取血清,加入 $10\text{ng}^{13}\text{C}_{12}$ 标记的四溴双酚 A、 $2\text{mL } 6\text{mol/L}$ 盐酸以及 6mL 异丙醇;
- (2) 加入等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂,经细胞超声破碎仪超声提取;
- (3) 置离心机内低速离心 5 分钟,移出上层提取液;
- (4) 重复步骤 (2)-(3) 两次;
- (5) 合并三次提取液,转移入分液漏斗;
- (6) 加入氯化钾溶液充分震荡,静置后分别收集有机相与水相,重复三次;
- (7) 合并三次收集的水相,加入等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂,充分震荡后,收集有机相;
- (8) 收集步骤 (6)-(7) 中产生的有机相,经无水硫酸钠干燥后,至旋转蒸发仪浓缩,转移到已知重量的玻璃离心管,氮气吹干至恒重;
- (9) 称重含样品的玻璃管,用重量法测定脂肪重量;
- (10) 称重后样品用甲醇复溶,经含有氧化锆颗粒的 Hybrid 固相萃取小柱去除脂类杂质,收集流出液体,氮吹仪浓缩至一定体积后,用 $0.2\ \mu\text{m}$ 过滤器过滤,过滤后至超高效液相色谱-串联质谱联用仪检测四溴双酚 A 浓度,

该方法所述生物包括实验动物、野生动物及人群,

步骤 (2) 中细胞超声破碎仪超声强度为 25%,超声 4 秒,停止 3 秒,共 7 分钟后移出提取液,重复三次。

一种用于少量生物血清中四溴双酚 A 分析的前处理方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物样品中有机污染物的检测分析技术,特别是涉及分析一种少量生物血清中四溴双酚 A 含量的样品提取、净化方法。

背景技术

[0002] 近年来,四溴双酚 A 作为使用量巨大的溴系阻燃剂之一被广泛应用于家用电器和日常用品中,如计算机、打印机、手机、电视机、洗衣机等电子产品以及纺织品、泡沫家具、建筑材料等。根据欧洲溴科学和环境论坛 (Brominated Science and Environmental Forum, BSEF) 报告,除约旦、以色列、美国、日本等,我国也是四溴双酚 A 主要生产国。由于相关产品生产规模的不断增长、含四溴双酚 A 电子废弃物的不断增加,以及可释放到环境中四溴双酚 A 数量的增加,使得人们开始关注四溴双酚 A 潜在的环境污染问题和对人体健康的影响。

[0003] 调查显示,由于四溴双酚 A 使用广泛,世界上很多国家和地区的土壤、沉积物、水体和大气等多种环境介质以及生物样品中均检测到四溴双酚 A 的赋存,且含量较高。由于频繁在环境介质及生物介质中检测出四溴双酚 A,使得公众对四溴双酚 A 的生物毒性倍加关注。目前研究发现四溴双酚 A 及其代谢产物在生物体反复暴露的情况下具有潜在的生物蓄积性,及细胞、免疫和内分泌干扰等生物毒性。近年来,四溴双酚 A 被认为是一种值得探讨和关注的潜在内分泌干扰物,也有研究认为四溴双酚 A 具有潜在环境持久性和生物累积性,可能引起持久性有机污染问题。欧洲保护东北大西洋海洋环境公约组织 (OSPAR) 自 2001 年将四溴双酚 A 纳入优化控制污染物后至今未将其取消,其报告中认为四溴双酚 A 具有持久性污染问题。基于此,开展四溴双酚 A 环境与健康方面的研究具有重要意义,特别是研究四溴双酚 A 在生物体血清中的浓度以及通过动物实验模拟四溴双酚 A 进入生物体后在血清中的分布规律对四溴双酚 A 的影响研究具有重要作用。

[0004] 由于四溴双酚 A 在生物血清样品中浓度较低,且血清样本基质比较复杂,同时生物血清样品可采集量较小,因此对血清样品前处理技术的要求就变得更加严格。很多样品在分析前没有经过很好的提取以及净化处理,分析时不能准确反应生物血清中四溴双酚 A 浓度,或者由于基质效应较大影响回收率。因此前处理技术是分析样品中四溴双酚 A 含量技术的关键,并直接影响四溴双酚 A 环境健康效应的研究发展。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对生物血清样品前处理复杂的问题提供一种样品用量少、回收率高、除杂效果好、准确迅速的提取与净化技术,减弱基质干扰作用,实现对少量生物血清样品中四溴双酚 A 的定量分析。本发明与现有技术的区别在于,采用细胞超声破碎的方式提取血清样品中四溴双酚 A,采用含有氧化锆颗粒的固相萃取小柱去除血清中脂类杂质,保证了提取效率并避免复杂的净化步骤损失样品中四溴双酚 A 含量。

[0006] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下所述。

[0007] 一种适用于分析少量生物血清样品中四溴双酚 A 的前处理方法 (图 1),包括以下

步骤：

- [0008] (1) 准确移取血清,加入 C13 标记的四溴双酚 A、稀盐酸以及异丙醇；
- [0009] (2) 加入等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂,经细胞超声破碎仪超声提取；
- [0010] (3) 置离心机内低速离心 5 分钟,移出上层提取液；
- [0011] (4) 重复步骤 (2)-(3) 两次；
- [0012] (5) 合并三次提取液,转移入分液漏斗；
- [0013] (6) 加入氯化钾溶液充分震荡,静置后分别收集有机相与水相,重复三次；
- [0014] (7) 合并三次收集的水相,加入等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂,充分震荡后,收集有机相；
- [0015] (8) 收集步骤 (6)-(7) 中产生的有机相,经无水硫酸钠干燥后,至旋转蒸发仪浓缩,转移到已知重量的玻璃离心管,氮气吹干至恒重；
- [0016] (9) 称重含样品的玻璃管,用重量法测定脂肪重量；
- [0017] (10) 称重后样品用甲醇复溶,经含有氧化锆颗粒的 Hybrid 固相萃取小柱去除脂类杂质,收集流出液体,氮吹仪浓缩至一定体积后,用 0.2 μm 过滤器过滤,过滤后至超高效液相色谱-串联质谱联用仪检测四溴双酚 A 浓度。
- [0018] 该方法所述生物包括实验动物、野生动物及人群。
- [0019] 本方法步骤 (2) 中细胞超声破碎仪超声强度为 25%,超声 4 秒,停止 3 秒,共 7 分钟后移除提取液,重复三次。

[0020] 本发明的优点和积极效果是:样品经细胞超声破碎仪超声萃取后,使用氯化钾洗涤提取液,为保证回收率采用有机溶剂反萃洗涤液,洗涤后提取液经无水硫酸钠干燥后浓缩至干称量脂肪重量,再用甲醇复溶后经含有氧化锆颗粒的 Hybrid 固相萃取小柱去除脂肪。血清样品中脂类杂质的去除是前处理程序中重要的一步,如果不能有效除尽,会影响检测结果并污染仪器。本方法所需血清量较少,净化效果好,除脂效果优异,操作简单,回收率较高,采用超高效液相色谱-串联质谱仪测定,检出限为 0.01ng/g fat,特别适用于少量生物血清样品中四溴双酚 A 含量的测定。

[0021] 本前处理方法的加标回收率如表 1 所示。

[0022] 表 1 本前处理方法的加标回收率

项目	回收率	
	平均值	RSD
加标 5ng, n=3	84.39%	8.89%
加标 10ng, n=3	92.38%	4.26%

附图说明

- [0024] 图 1 为分析方法流程图；
- [0025] 图 2 为标准曲线图；
- [0026] 图 3 为血清样品不同提取方式的回收率比较图；
- [0027] 图 4 为血清样品不同净化除脂类杂质方式的回收率比较图。

具体实施方式

[0028] 下面结合实施例对本发明的技术方案做进一步的描述。

[0029] (1) 血清样品的前处理

[0030] 准确移取血清,加入 10ng C13 标记的四溴双酚 A、2mL6mol/L 盐酸以及 6mL 异丙醇,加入 20mL 等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂,经细胞超声破碎仪超声提取,细胞超声破碎仪超声强度为 25%,超声 4 秒,停止 3 秒,共 7 分钟,之后置离心机内以 3000 转每分钟的速度离心 5 分钟,移出上层提取液,重复三次;合并三次提取液,转移入分液漏斗,加入 20mL 质量浓度为 1% 的氯化钾,溶液充分震荡洗涤,静置后分别收集有机相与水相,重复三次;收集的水相部分加入 20mL 等体积混合的甲基叔丁基醚与正己烷试剂充分震荡反萃,静置后收集有机相;合并所有有机相用无水硫酸钠干燥,经旋转蒸发器浓缩后,转移到已知重量的玻璃离心管,氮气吹干至恒重;称重含样品的玻璃管,用重量法测定脂肪重量;称重后样品用甲醇复溶,经含有氧化锆颗粒的 Hybrid 固相萃取小柱(美国 Supelco 公司)去除脂类杂质,收集流出液体,经氮吹仪浓缩至 1mL 后,用 0.2 μm PTFE 过滤器(美国 Pull 公司)过滤,过滤后至超高效液相色谱-串联质谱联用仪检测四溴双酚 A 浓度。

[0031] (2) 利用超高效液相色谱-串联质谱分析四溴双酚 A 浓度

[0032] 仪器型号:超高效液相色谱-串联质谱联用仪 ACQUITY UPLC-MS/MS(美国 Waters 公司),包括四元梯度液相色谱泵,高压二元梯度泵,以及 Masslynx4.1 工作站。

[0033] 色谱条件:采用美国 Waters 公司生产的 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(1.7 μm, 500mm×2.1mm I.D);柱温 40℃;流速 0.30mL/min;进样量 10 μL;流动相 A 为超纯水,流动相 B 为甲醇;采用梯度洗脱,初始浓度为 70% B,0~0.5min 为 70% B 线性升高到 100% B,0.5~2min 为 100% B,2min 为瞬间降至 70% B,2~3min 为 70% B,总体运行时间共计 3min。

[0034] 质谱条件:采用电喷雾负离子检测模式(ESI⁻);毛细管电压为 3.5kV;离子源温度为 120℃;脱溶剂气为氮气(N₂);锥孔反吹气流速为 50L/h;脱溶剂气温度为 350℃;脱溶剂气流速为 800L/h;碰撞室压力为 3.8×10³mbar;质量分析器低端分辨率 LM1 为 13.0, LM2 为 13.0;高端分辨率 HM1 为 13.0V, HM2 为 13.0V;离子能量 1 为 1.0, 2 为 4.0;采用 MRM 多通道检测。

[0035] (3) 标准曲线的绘制

[0036] 取混合均匀的空白血清样品,按照步骤(1)中所述血清样品的前处理方法分别对样品进行处理。待处理结束后,用获得的空白血清样品配置系列基质四溴双酚 A 与 C13 标记的四溴双酚 A 标准曲线。以四溴双酚 A 对 C13 标记的四溴双酚 A 的峰面积比与浓度值做定量标准曲线(图 2),用以计算样品中分析物的量。

[0037] (4) 样品浓度及回收率的测定

[0038] 血清样品采集于实验用品系为 Wistar 的大鼠。将 18 只大鼠于实验动物房内适应性饲养一周,观察无异常后随机分为 3 组,分别为对照组、低剂量组、高剂量组。对照区大鼠不做处理,低剂量组大鼠每日上午 8 时经口灌胃给予 10mg/kg 剂量的四溴双酚 A 的羧甲基纤维素钠悬浊液,高剂量组大鼠每日上午 8 时经口灌胃给予 30mg/kg 剂量的四溴双酚 A 的羧甲基纤维素钠悬浊液,连续给药 90 天后,将大鼠麻醉,心脏穿刺取血。所需血液室温静置 15 分钟,3000 转每分钟离心 10 分钟,分离上层血清,置于保温箱内迅速带回实验室,

于 -80°C 低温冰箱内贮藏。之后按照步骤 (1) 对样品进行超声提取, 提取液经氯化钾洗涤, 并用有机溶剂反萃洗涤液, 洗涤后提取液经无水硫酸钠干燥后浓缩至干称量脂肪重量, 再用甲醇复溶后经美国色谱科的 Hybrid 固相萃取小柱去除脂类杂质。之后经超高效液相色谱-串联质谱仪检测, 与步骤 (3) 中标准曲线对照获得血清中四溴双酚 A 的含量。以样品检测得到的四溴双酚 A 对 C13 标记的四溴双酚 A 的峰面积比代入步骤 (3) 中标准曲线中, 求得的浓度即为样品中四溴双酚 A 的浓度。

[0039] 同时, 根据样品中 C13 标记的四溴双酚 A 的峰面积与相同浓度标准曲线中 C13 标记的四溴双酚 A 的峰面积做对比, 计算回收率。方法回收率按照下式进行计算:

$$[0040] \quad R = (A/A_0) \times 100\%$$

[0041] R- 回收率, %;

[0042] A- 测定样品中 C13 标记的四溴双酚 A 的峰面积;

[0043] A₀- 标准曲线中相同浓度下 C13 标记的四溴双酚 A 峰面积。

[0044] 利用本发明检测经口暴露不同剂量四溴双酚 A 大鼠血清中四溴双酚 A 浓度, 结果如表 2 所示。

[0045] 表 2 实际血清样品中四溴双酚 A 浓度

[0046]

剂量组	样品量 n	四溴双酚 A 浓度 ($\mu\text{g/g, fat}$)
对照区	6	0.00 \pm 0.00
低剂量组	6	19.53 \pm 6.63
高剂量组	6	38.11 \pm 22.56

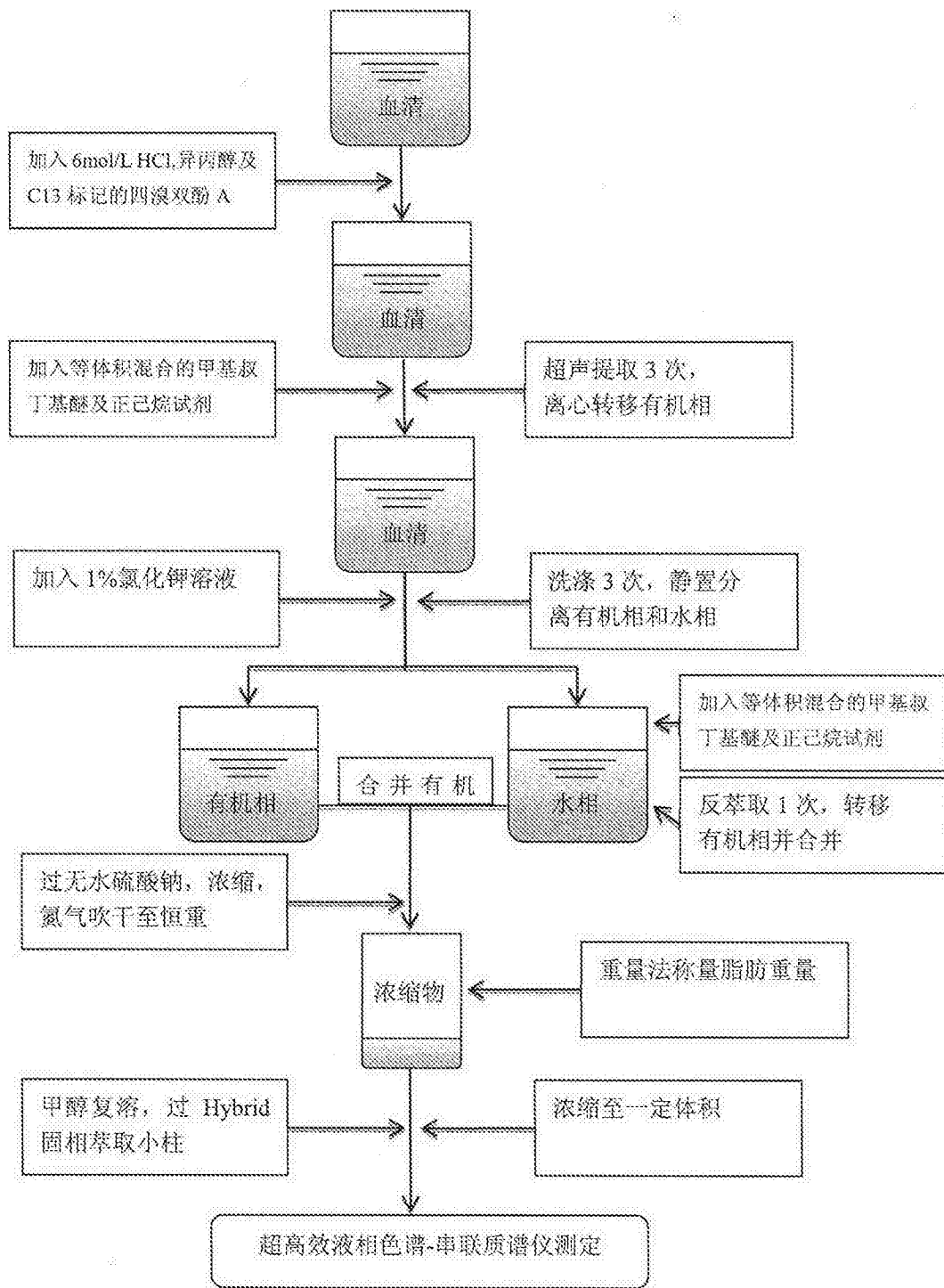


图 1

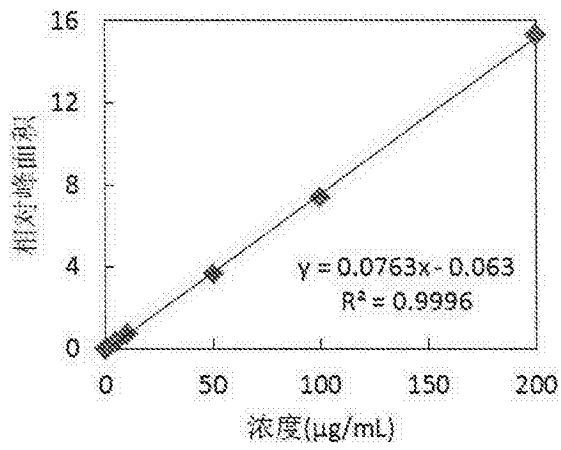


图 2

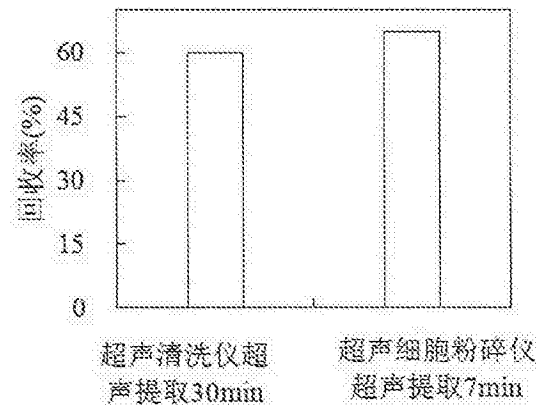


图 3

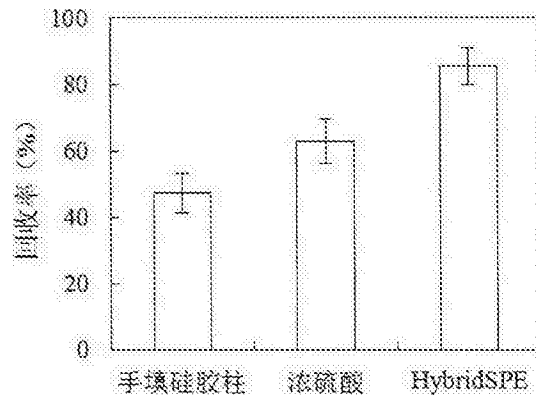


图 4