

文章编号 1006-8147(2014)02-0159-03

论 著

HPLC 法测定妊娠妇女绒毛组织中亚硫酸盐的含量

郑艳红¹, 杨金荣², 董伟林², 方步武³

(1.天津医科大学第二医院药剂科, 天津 300211; 2.天津医科大学药学院, 天津 300070; 3.天津医科大学药理学教研室, 天津 300070)

摘要 目的:建立生物检材中亚硫酸盐的测定方法。方法:采用高效液相色谱荧光检测方法,以单溴二胺作为衍生剂;色谱柱为 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-0.25%乙酸水溶液(20:80),用磷酸调 pH 值至 2.8;荧光激发波长为(Ex)392 nm,发射波长为(Em)479 nm。结果:亚硫酸盐在 0.012 6~1.26 5 μg·mL⁻¹ 的浓度范围内线性良好,平均回收率为 86.81%,相对标准偏差(RSD)为 5.92%。结论:该方法准确可靠,适用于亚硫酸盐的含量测定。

关键词 亚硫酸盐;妊娠;子宫绒毛组织;高效液相色谱法

中图分类号 R17

文献标志码 A

二氧化硫(SO₂)是一种全身性致毒物,是大气中最常见的污染物之一^[1],其体内衍生物为亚硫酸盐和亚硫酸氢盐^[2],可造成动物不同组织氧化损伤和细胞 DNA 损伤^[3]。本试验通过高效液相色谱法建立人绒毛组织中亚硫酸盐含量的测定方法,进一步探讨 SO₂ 吸入后在孕妇女子宫绒毛组织的分布情况。通过正常妊娠妇女及胚胎停育患者绒毛组织中亚硫酸盐含量的对比进一步确定 SO₂ 与稽留流产^[4-5]患病率之间的关系。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 日本岛津高效色谱仪(SCL-6A 色谱系统控制器,LC-6A 恒流泵,SPD-6AV 荧光检测器,Anastar 色谱工作站);AR2140 型电子分析天平(北京赛多利斯公司);TDL-50B 低速台式离心机(上海安亭科学仪器公司);HQQ005 超声波清洗机(无锡超声电子设备厂);YKH-1 型液体快速混合器(江西医疗器械厂)。

1.1.2 试剂 无水亚硫酸盐,分析纯(天津市化学试剂批发公司,20061110);单溴二胺,标准品(SIG-MA,016K1026);硼氢化钠,分析纯(上海天莲精细化工有限公司,2007-03-01-157);Tris,分析纯(上海蓝季科技发展有限公司,070226);样品为新鲜人绒毛组织,由武警医学院提供;甲醇,色谱纯(天津市协和昊鹏色谱科技有限公司,070801);其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.25%乙酸水溶液(20:

80),用磷酸调 pH 值至 2.8;荧光激发波长(Ex):392 nm;发射波长(Em):479 nm;流速:1.0 mL·min⁻¹;灵敏度:0.02(AUFS);进样量:20 μL。

1.2.2 溶液的配制

1.2.2.1 试剂的配制:精密称取单溴二胺 10 mg,于 100 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀,得 0.1 mg·mL⁻¹ 的单溴二胺溶液;精密称取硼氢化钠 100 mg,于 100 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀,得 1 mg·mL⁻¹ 的硼氢化钠溶液;精密称取 Tris 100 mg,加水定容于 100 mL 容量瓶中,加盐酸调至 pH=3.8,摇匀,即得 1 mg·mL⁻¹ 的 Tris-HCl 溶液。

1.2.2.2 缓冲液的配制:分别精密称取无水磷酸二氢钾 0.425 9 g,磷酸氢二钾 0.272 2 g,置 100 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀即为母液,用时稀释 1000 倍。

1.2.2.3 亚硫酸钠溶液的配制:精密称取亚硫酸钠 126 mg,置 100 mL 容量瓶中,用缓冲液定容,摇匀,稀释即得 1.26 μg·mL⁻¹ 亚硫酸钠储备液。

1.2.2.4 色谱条件的专属性:分别精密量取空白溶液衍生产物,亚硫酸钠溶液衍生产物和样品溶液衍生产物 20 μL,在 1.2.1 的色谱条件下进行检测,分别记录色谱图。

1.2.3 反应条件的选择

1.2.3.1 衍生方法^[7-8]:取浓度为 1.26 μg·mL⁻¹ 亚硫酸钠溶液 100 μL 于离心管中,依次加入硼氢化钠 70 μL、单溴二胺 25 μL 混匀,将混合液置于 60 ℃水浴锅中衍生 30 min,待反应完成后取出,冷却至室温。加入高氯酸 50 μL 以 3 000 r·min⁻¹ 的速度离心 10 min,取上清液,加 Tris-HCl 20 μL,混匀,以 3 000 r·min⁻¹ 的速度离心 8 min,取上清液即得。

1.2.3.2 衍生剂的用量:取浓度为 1.26 μg·mL⁻¹ 亚硫酸钠溶液 100 μL,共 7 份,照 1.2.3.1 衍生方法,

作者简介 郑艳红(1986-),女,药师,硕士在读,研究方向:药理学;
通信作者:方步武, E-mail:fangdch@aliyun.com。

分别加入单溴二胺溶液 5、10、15、20、25、30、35 μL , 考察衍生剂的最佳用量。

1.2.3.3 反应时间考查: 取浓度 $1.26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硫酸钠溶液 100 μL , 共 7 份, 照 1.2.3.1 衍生方法, 分别反应 5、10、15、20、25、30、40 min, 以确定最佳反应时间。

1.2.3.4 反应温度考查: 取浓度 $1.26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硫酸钠溶液 100 μL , 共 5 份, 照 1.2.3.1 衍生方法, 分别在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中衍生 30 min, 确定最佳反应温度。

1.2.4 线性与范围 分别精密量取 $1.26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚硫酸钠储备液 0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用缓冲液定容, 摇匀, 即得浓度为 0.012 6、0.037 5、0.063、0.126、0.375、0.63 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的亚硫酸钠对照品溶液。取上述对照品溶液各 100 μL , 照 1.2.3.1 衍生方法, 精密量取 20 μL , 在 1.2.1 的色谱条件下进行检测, 分别记录色谱图。

1.2.5 重复性试验 取 $0.126 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照溶液 100 μL , 照 1.2.3.1 方法衍生, 精密量取 20 μL , 照 1.2.1 的色谱条件, 连续测定 6 次, 测定峰面积, 计算 *RSD*。

1.2.6 日内差试验 取浓度为 1.26、0.126、0.031 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 衍生的供试液, 同一天内每隔 3 h 分别测定 3 次, 测定峰面积, 计算 *RSD*。

1.2.7 日间差试验 取浓度为 1.26、0.126、0.031 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 衍生的供试液, 各浓度每天分别测定 1 次, 各浓度连续测定 3 d, 测定峰面积, 计算 *RSD*。

1.2.8 回收率试验 取已测知浓度的生物样品供试液 100 μL , 共 9 份, 分别精密加入对照品溶液适量, 使其成为高、中、低 3 种浓度, 照 1.2.3.1 方法衍生, 精密量取上清液 20 μL , 照 1.2.1 的色谱条件进行检测, 计算回收率。

1.2.9 定量限试验 在上述色谱条件下, 取已测知浓度的生物样品供试液逐级稀释后衍生, 进行测定, 进样量为 20 μL , 记录色谱图, 按 $S/N=10$ 计算定量限。

1.2.10 生物样品稳定性 取同一浓度亚硫酸钠供试品溶液衍生物, 在该试验条件下分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定, 计算 *RSD*。

1.2.11 样品的处理 收集稽留流产患者及正常妊娠妇女行人工流产的绒毛组织, 用生理盐水将浮血冲洗掉, 装入 2 mL 冻存管, 编号后于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻, 放入冰盒内取回。将绒毛组织用 5 mL 玻璃匀浆器匀浆, 匀浆液装于 1.5 mL EP 管中, 以 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度离心 5 min, 精密量取 100 μL 上清液, 照 1.2.3.1 方法衍生, 取上清液作为供试品溶液。取供试品溶液 20 μL , 照 1.2.1 的色谱条件进行检

测, 分别记录色谱图。按标准曲线法计算样品中亚硫酸盐的含量(以亚硫酸钠计)。

2 结果

2.1 色谱条件的专属性检测结果 见图 1~3。

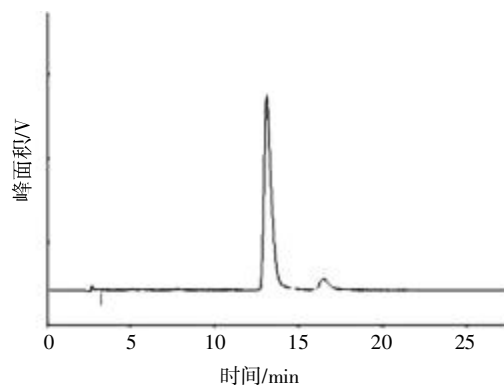


图1 衍生试剂色谱图

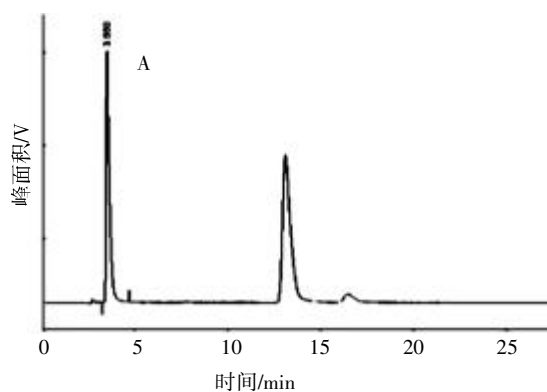


图2 亚硫酸盐标品色谱图

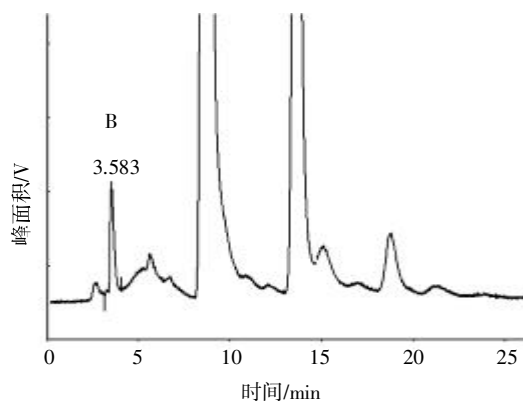


图3 样品色谱图

由色谱图可以看出, 在上述色谱条件下, 亚硫酸钠对照品溶液衍生物的保留时间约为 3.5 min, 供试品溶液衍生后亚硫酸钠衍生物与其它杂质峰分离度良好, 空白溶液衍生产物对对照品无干扰。

2.2 线性与范围考察 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行线性回归, 计算回归方程如下, $Y=343\,376X+1\,554.1$; $r=0.999\,3$ ($n=3$)。结果表明, 亚硫酸盐在 $0.012\,6\sim 1.26 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.3 反应条件的选择 取浓度为 $1.26 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 亚硫酸钠溶液 $100 \mu\text{L}$, 照 1.2.3.1 衍生方法, 进行一系列考察, 得出最佳反应条件如下, 衍生剂用量为 $25 \mu\text{L}$, 反应时间为 30 min , 最佳反应温度为 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 重复性试验 连续测定 6 次, 测定峰面积 RSD 为 0.87% , 精密度良好。

2.5 日内差试验 取低中高浓度供试品试液进行衍生, 测得日内标准偏差分别为 0.28% 、 0.39% 、 1.01% , 该方法的日内精密度良好。

2.6 日间差试验 取低中高浓度供试品试液进行衍生, 日间标准偏差 1.12% 、 1.30% 、 1.45% , 该方法的日间精密度良好。

2.7 回收率试验 见表 1。

表 1 含量测定供试品回收率测定结果

已知样 品的量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入对照 品的量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	实测量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD / %
0.7324	1.26	1.889 6	1.157 2	91.84	90.94	2.73
		1.902 2	1.169 8	92.84		
		1.842 8	1.110 4	88.13		
	0.126	0.832 8	0.100 4	79.68	84.84	7.85
		0.845 2	0.112 8	89.52		
		0.839 9	0.107 5	85.32		
	0.031 5	0.758 8	0.026 4	83.81	84.66	5.41
		0.761 1	0.028 7	91.11		
		0.757 3	0.024 9	79.05		

由数据可以看出, 该试验条件下, 对不同浓度生物样品加入不同浓度对照品, 进行回收率测定, 平均回收率为 86.81% , 均在 $85\% \sim 115\%$ 之间, RSD 为 5.92% , 该试验条件下生物样品准确度良好。

2.8 定量限试验 取已测知浓度的生物样品供试液逐级稀释, 计算其最小检出浓度为 0.063 ng 。

2.9 生物样品稳定性 对同一浓度亚硫酸钠供试品溶液在 24 h 内进行测定, RSD 为 2.02% , 该试验条件下亚硫酸钠供试品溶液稳定性良好。

3 讨论

3.1 原理 参考文献[9]方法测定的总亚硫酸盐为组织中所有的亚硫酸盐形式, 包括与蛋白以二硫键结合的硫—碘酸盐, 与低分子基团结合的硫—碘酸盐及游离的亚硫酸盐^[9]。测定原理依据以下思路: (1)还原组织匀浆中与蛋白质结合的亚硫酸盐和游离的亚硫酸盐为巯基化合物。(2)与巯基荧光试剂(mBrB)发生柱前衍生^[10-11]。(3)通过色谱柱分离衍生物。(4)通过荧光检测法, 以亚硫酸钠(Na_2SO_3)标准物质保留时间定性, Na_2SO_3 标准曲线定量。

3.2 流动相选择 根据文献中报道流动相为甲醇—

0.25% 乙酸水溶液($10:90$), 磷酸调 pH 值至 2.8 , 经考察保留时间过于滞后, 且峰形有脱尾, 该流动相不甚理想; 后改变流动相为 $30:70$ 体积比甲醇— 0.25% 乙酸水溶液, 经考察保留时间显著提前, 但分离度不甚理想; 后又分别考察流动相为 $25:75$ 体积比及 $28:72$ 体积比甲醇— 0.25% 乙酸水溶液, 但峰形及峰位始终不太理想, 考察流动相为 $20:80$ 体积比甲醇— 0.25% 乙酸水溶液, 峰形、峰位、分离度均较好, 且保留时间适中, 因此定为该试验最终流动相。

3.3 反应试剂的要求 本试验用硼氰化钠做衍生剂, 单溴二胺做荧光剂, 但硼氰化钠是强还原剂, 不稳定, 需现用现配, 否则失效后会影响到衍生反应效果, 造成色谱峰面积变小甚至不出峰。

3.4 试验意义 国内外大量对出生结局的影响的研究结论较为一致, 孕期暴露于 SO_2 对足月低出生体重有影响, 且相对于早产、胎儿宫内发育迟缓(FGR)的影响大, 存在明显的剂量—效应关系。但对于妊娠期不同阶段的暴露对出生结局的影响的研究结果不尽相同。另外, 通过动物试验, 推测 SO_2 可能对早期胚胎发育产生不良影响, 甚至发生胚胎发育停滞, 但需要进一步研究来论证此观点。本试验建立生物检材中亚硫酸盐的含量测定的方法, 以检测孕妇绒毛组织中亚硫酸盐的含量, 通过健康及患者组织中亚硫酸盐含量的对比, 进一步确定二氧化硫与稽留流产患病率之间的关系。

参考文献:

- [1] 郑艳红, 王丽, 杨金荣, 等. 妊娠妇女稽留流产率与体内亚硫酸盐含量相关性[J]. 慢性病学杂志, 2013, 14(6): 448
- [2] 朱春红. 亚硫酸盐在食品加工中的作用与危害[J]. 技术与市场, 2012, 19(3): 95
- [3] 孟紫强, 张波, 秦国华, 等. 二氧化硫对小鼠不同脏器 DNA 的损伤作用[J]. 中国环境科学, 2005, 25(4): 424
- [4] 殷震惠. 稽留流产病因研究进展 [J]. 现代诊断与治疗, 2010, 21(2): 88
- [5] 黄宏毅. 对稽留流产的病因分析探讨[J]. 中外医疗, 2011, 30(28): 91
- [6] 郑林媚, 洪新如, 孙庆华. 空气污染对胎儿生长发育的影响及作用机制[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(3): 1
- [7] 李金淑, 张华山, 王红. 新型荧光试剂柱前衍生高效液相色谱定量分析小鼠脑脊液中氨基酸类神经递质[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 40(4): 65
- [8] 彭晓俊, 邓爱华, 庞晋山. 高效液相色谱柱后衍生测定脱水蔬菜中的亚硫酸盐[J]. 分析科学学报, 2012, 28(1): 83
- [9] 孟紫强, 李瑞金, 张欣. HPLC 荧光检测法测定 SO_2 吸入后小鼠脑、心和肺亚硫酸盐水平[J]. 环境科学学报, 2005, 25(3): 346
- [10] 邹小琴, 毛桂福, 钟小斌, 等. 衍生化—HPLC 法测定人血清中丙戊酸浓度[J]. 中国当代医药, 2012, 19(23): 94
- [11] 陈再洁, 殷金龙, 李坤. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定人参中 17 种氨基酸的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(35): 3334

(2013-09-23 收稿)