

· 检验技术 ·

双壳类水产品中 (+)-anti-BPDE-DNA 加合物 HPLC/FLD 检测*

齐琳¹, 刘晓晨¹, 李健², 杨波¹, 孙文平¹, 于腾¹, 李发胜¹, 刘辉¹

摘要:目的 建立检测双壳类水产品中 (+)-反-7,8-二羟基-9,10-环氧苯并(a)芘(BPDE)-DNA 加合物的高效液相色谱荧光法(HPLC/FLD)。方法 用组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 6 种双壳类水产品组织中的 DNA, 0.1 mol/L HCl 90 °C 酸解 4 h, 乙酸乙酯充分萃取酸解产物——苯并(a)芘-四醇。以 CenturySIL C18-BDS 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm)分离; 洗脱流动相: V(甲醇)/V(水) = 55/45; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 激发波长: 265 nm, 发射波长: 395 nm; 荧光检测苯并(a)芘-四醇的含量。结果 该方法的检测限为 0.3 ng/mL, 在 0.5 ~ 100 ng/mL 范围内呈良好的线性关系($r^2 = 0.9960$); 日内相对标准偏差(RSD)为 2.8% ~ 4.2%, 日间 RSD 为 3.2% ~ 5.8%; 双壳类水产品中 (+)-anti-BPDE-DNA 含量为 13.44 ~ 152.7 μg/kg, RSD 为 3.0% ~ 6.5%; 加标回收率为 86.9% ~ 91.6%, RSD 为 3.1% ~ 7.3%。结论 该法简便、快速、灵敏度高, 可用于双壳类水产品中 (+)-anti-BPDE-DNA 加合物的检测。

关键词: 高效液相色谱荧光法; (+)-反-二羟基-9,10-环氧苯并(a)芘-DNA 加合物; 苯并(a)芘-四醇; 双壳类
中图分类号: R 115 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2014)03-0371-03 DOI: 10.11847/zgggws2014-30-03-37

Determination of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts metabolized from benzo[a]pyrene in bivalves by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection

QI Lin*, LIU Xiao-chen, LI Jian, et al (* College of Medical Laboratory, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning Province 116044, China)

Abstract: Objective To develop a simple and highly sensitive high-performance liquid chromatography/fluorescence method for the determination of benzo[a]pyrene(BaP)-tetrols released after acid hydrolysis of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide(BPDE)-DNA adducts metabolized from benzo[a]pyrene in bivalves. **Methods** The tissue DNA in bivalves were extracted by reagent kit and the (+)-anti-BPDE-DNA adducts were hydrolyzed in 0.1 mol/L HCl at 90 °C for 4 hours. The acid-hydrolysis products(BaP-tetrols) of DNA adducts were extracted by ethylacetate and measured by high-performance liquid chromatography/fluorescence detection. Samples were separated on CenturySIL C18-BDS column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) and the elution was isocratic using a 55% methanol:45% water(v/v) mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min; fluorescence detection was conducted at 265 nm (excitation) and 395 nm (emission), with the injection volume of 20 μL. **Results** The operating linear range was at least 0.5 - 100 ng/mL ($r^2 = 0.9960$) and the detection limits(S/N = 3) was 0.3 ng mL⁻¹. Coefficients of variation for within-run and between-run assays were 2.8% - 4.2% and 3.2% - 5.8%, respectively. The content of (+)-anti-BPDE-DNA adducts were 13.44 - 152.7 μg/kg and the relative standard deviations(RSDs) were 3.0% - 6.5%. The average recoveries were 86.9% - 91.6% and the RSDs were 3.1% - 7.3%, respectively. **Conclusion** The method was proved to be sensitive, accurate, rapid and could be applied to the determination of (+)-anti-BPDE-DNA adducts in bivalves.

Key words: high-performance liquid chromatography/fluorescence detection; (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide -DNA adducts; benzo[a]pyrene-tetrols; bivalves

苯并(a)芘(benzo[a]pyrene, BaP)是环境致癌化合物多环芳烃中最具有代表性的致癌物,会污染水体。海洋生物中双壳类贝类每日可滤水约 1500 L^[1],能对 BaP 等多环芳烃污染物产生生物蓄积和代谢^[2]。BaP 进入生物体内会被细胞色素 P450 氧化成 7,8-环氧苯并芘,再经水解酶生成 7,8-二羟基苯并芘,进一步氧化成 7,8-二羟基-9,10-环氧苯并芘(benzo[a]pyrene diol-epoxide, BPDE)。

BPDE 能与 DNA 或蛋白质结合生成共价化合物,是 BaP 在体内的终致癌物^[3]。BPDE 有 (+/-)-anti-BPDE 和 (+/-)-syn-BPDE 4 种异构体,其化学活性也各不相同,其中 (+)-anti-BPDE 的致畸性和致癌性大大强于其他 3 种异构体,因此 (+)-anti-BPDE 受到更为广泛的关注。本试验采用组织基因组 DNA 提取试剂盒提取 6 种双壳类水产品中的 DNA,用高效液相色谱荧光法(high-performance liq-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770724)

作者单位:1. 大连医科大学检验医学院,辽宁 大连,116044; 2. 大连医科大学附属第一医院检验科

作者简介:齐琳(1987-),女,河北昌黎人,硕士在读,研究方向:有机污染物与人体健康关系。

通讯作者:李发胜, E-mail: lfs920@sohu.com

数字出版日期:2013-7-8 15:36

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20130708.1536.015.html>

uid chromatography/fluorescence detection, HPLC/FD)检测(+) -anti-BPDE-DNA 加合物的酸解产物苯并芘-四醇(benzo[a]pyrene-tetrols, BaP-tetrols)的含量,以 BaP-tetrols 的含量间接反映(+) -anti-BPDE-DNA 加合物的含量^[4-5],了解其在生物体内的蓄积情况。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 在辽宁省大连市旅顺盐场海鲜市场随机购买蛭子、扇贝、花蚬子、白蚬子、海虹和毛蛤共 6 种双壳类水产品,保存于 4 °C 冰箱。

1.2 仪器与试剂 Agilent 1200 型高效液相色谱系统:配四元泵、荧光检测器、自动进样器及色谱数据处理工作站(美国安捷伦公司),GT16-3 型高速离心机(北京时代北利离心机有限公司),XW-80A 型漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂),JA1003 型电子天平(上海恒丰科学仪器有限公司),Thermo 超纯水系统(美国 Barnstead 公司),LRH-150B 生化培养箱(广东医疗器械厂)。(+) -anti-BPDE 标准品为美国国家癌症研究所(NCI)惠赠,甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),盐酸、乙酸乙酯、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)均为分析纯(成都化学试剂厂),DNA 标准品为小牛胸腺 DNA,纯度 > 99%(美国 Sigma 公司),组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),所有实验用水均为超纯水。

1.3 样品制备 将 6 种实验原料分别洗净、沥干、去壳、粉碎、混匀,准确称取 50 mg,严格按照组织基因组 DNA 提取试剂盒的提取方法提取水产品组织中的 DNA,0.1 mol/L HCl,90 °C 酸解 4 h,乙酸乙酯充分萃取酸解产物-BaP-tetrols,水浴挥干提取液,复溶于 200 μ L DMSO 中,装于色谱进样瓶中,于 4 °C 下保存待测。

1.4 标准溶液配制 准确称取一定量 DNA 标准品,用超纯水配制成 20 μ g/mL DNA 标准溶液,4 °C 冰箱保存。准确称取一定量(+) -anti-BPDE 标准品溶于 DMSO 中,配制成 20 μ g/mL 溶液,冰水浴下与 10 倍体积 DNA 标准溶液混合,漩涡混匀后,放入 37 °C 生化培养箱中孵育 24 h,制得(+) -anti-BPDE-DNA 加合物标准溶液,0.1 mol/L HCl,90 °C 酸解 4 h,乙酸乙酯充分萃取 BaP-tetrols,水浴挥干提取液,复溶于 200 μ L DMSO 中,作为 21.2 μ g/mL BaP-tetrols 标准储备母液。

1.5 色谱条件 色谱柱:CenturySIL C18-BDS (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:V(甲醇)/V(水) = 55/45;流速:1.0 mL/min;激发波长:265 nm,发射波长:395 nm;进样量:20 μ L。

1.6 线性关系考察及检测限 取标准储备母液以 DMSO 进行逐步稀释配制成 0.5、1、2、5、10、20、50、80、100 ng/mL 一系列的标准溶液。分别参照 1.5 的步骤操作,以标准溶液浓度为横坐标,以测得的峰面积为纵坐标作图,用加权最小二乘法进行计算,得到相应的回归方程。取信噪比(S/N) = 3:1 为 BaP-tetrols 的检测限。

1.7 精密度试验 配制浓度分别为 5、50 和 80 ng/mL 的 BaP-tetrols 标准溶液,各取 20 μ L,分别参照 1.5 的步骤操作,每个浓度取 6 个样品同 1 d 内测定,计算日内相对标准偏差(relative standard deviations, RSD);每个样品每天测定 1 次,连续测定 6 d,计算日间 RSD。

1.8 实验样品分析及加标回收率试验 取按照 1.3 步骤样制备的 6 个样品溶液各 1 份,参照 1.5 步骤进行检测,重复 3 次测定。设定 5、50、80 ng/mL 3 个加标水平,重复 3 次测定。

2 结果

2.1 方法的专属性(图 1~3) 本方法得到的色谱

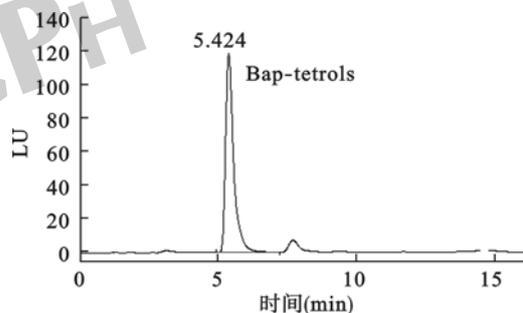


图 1 21.2 μ g/mL 标准品色谱图

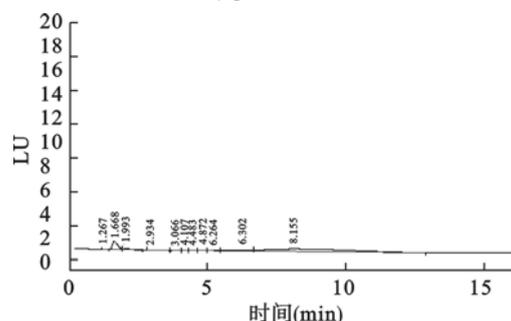


图 2 空白组织色谱图

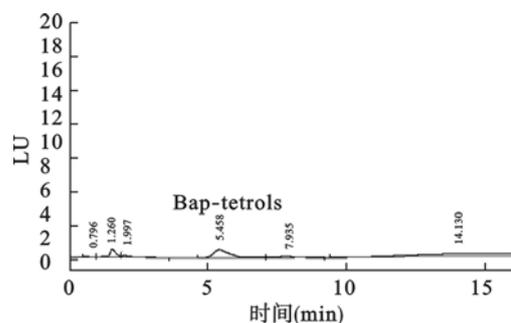


图 3 样品色谱图

峰峰型良好,保留时间适中,无杂质峰干扰。50 ng/mL 标准品色谱图保留时间为 5.424 min; 样品色谱图保留时间为 5.458 min。

2.2 线性、检测限和精密度 (+)-anti-BPDE-DNA 加合物在 0.5 ~ 100 ng/mL 范围内的线性回归方程为 $y = 0.3756x + 1.2302$ (y 为峰面积; x 为浓度, ng/mL), 相关系数 $r^2 = 0.9960$, 相关性较好。本实验的分析条件下最低检测限为 0.3 ng/mL。根据 1.7 的步骤操作, 可以计算出日内 RSD 为 2.8% ~ 4.2%, 日间 RSD 为 3.2% ~ 5.8%, 表明该方法精密度良好。

2.3 实验样品分析及加标回收率试验(表 1) 6 种双壳类水产品中 (+)-anti-BPDE-DNA 含量为 13.44 ~ 152.7 μg/kg, RSD 为 3.0% ~ 6.5%; 加标回收率为 86.9% ~ 91.6%, RSD 为 3.1% ~ 7.3%。表明该方法具有较高的准确度。

表 1 样品分析及加标回收率($n=3$)

样品	含量 (μg/kg)	RSD (%)	理论加入量 (ng)	实际测得量 (ng)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
蛏子	58.71	4.3	5	3.944	78.9	86.9	4.7
			50	45.17	90.3		3.2
			80	73.22	91.5		4.4
扇贝	13.44	5.9	5	3.947	79.0	87.4	7.3
			50	45.61	91.2		3.3
			80	73.61	92.0		6.5
花蚬子	94.32	3.1	5	4.374	87.5	91.6	3.6
			50	46.96	93.9		3.1
			80	74.79	93.5		3.3
白蚬子	152.7	3.0	5	4.318	86.4	89.9	5.3
			50	45.57	91.1		2.8
			80	73.84	92.3		4.7
海虹	34.33	5.3	5	4.431	88.6	90.1	5.7
			50	45.27	90.5		5.4
			80	73.05	91.3		6.3
毛蛤	14.12	6.5	5	3.786	75.7	87.2	6.9
			50	46.34	92.7		5.8
			80	74.60	93.2		6.6

3 讨论

BPDE 加合物的检测方法主要有 32P-后标记

法、免疫化学方法、毛细管电泳-激光激发荧光检测法、色谱法及色谱-质谱联用法等方法。32P-后标记法方法敏感度高,但特异性较差,且所检测到的是复杂混合加合物的总量,操作步骤繁琐,不易掌握^[6]。免疫化学方法和毛细管电泳-激光激发荧光检测法则所需样本量大,抗体间存在交叉反应,对于非抗原性加合物和未知抗原的加合物不能进行检测^[7]。本试验通过 HPLC/FD 法,成功地完成了对 6 种双壳类水产品中 (+)-anti-BPDE-DNA 加合物含量的测定。该方法简便、快速、灵敏度高。

本实验室曾对上述水产品中 BaP 的含量进行过检测,含量范围在 0.9864 ~ 1.8170 μg/kg 之间^[8],均低于欧盟指令 1881/2006 EC 规定水产品中 BaP 的限量 2 μg/kg^[9] 和我国 GB 2762 - 2005《食品污染物限量》规定限量 10 μg/kg^[10]。但 BaP 在水产品中的代谢产物 (+) anti-BPDE-DNA 加合物的含量却为 13.44 ~ 152.7 μg/kg 之间,大大高于 BaP 的含量,说明其在生物体内产生了蓄积。(+) anti-BPDE-DNA 加合物可能更准确地反应水产品中 BaP 污染的剂量,提供化学毒物的代谢活化信息和生物体内 BaP 暴露之后的致癌危险程度。

参考文献

- [1] 张平,刘丹,贾秀岩,等. 近海海产品与甲型肝炎关系的病例对照研究[J]. 中国公共卫生,2003,19(2):189-190.
- [2] Bouzas A, Aguado D, Marti N, et al. Alkylphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in eastern Mediterranean Spanish coastal marine bivalves[J]. Environ Monit Assess, 2011, 176: 169-181.
- [3] 安社娟. 多环芳烃致癌的分子毒理学研究进展[J]. 国外医学卫生分册,2005,32(1):10-13.
- [4] Padrós J, Pelletier E. Subpicogram determination of (+)-anti-benzo[a]pyrene diol-epoxide adducts in fish albumin and globin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 426:71-77.
- [5] Smith BW, Hurtubise RJ. New methodology for the characterization of (±)-anti-BPDE-DNA adducts and tetrol I-1 with solid-matrix phosphorescence[J]. Analytica Chimica Acta, 2004, 502: 149-159.
- [6] Boysen G, Hecht SS. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods[J]. Mutation Research, 2003, 543:17-30.
- [7] 张波. DNA 加合物检测方法研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2003, 11(4):300-302.
- [8] 刘晓晨,齐琳,杨波,等. 大连地区 6 种贝类体内苯并(a)芘和 3-羟基苯并芘含量测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(5):1243-1247.
- [9] Commission Regulation (EC). No. 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [S]. 2006-09-19.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 2762 - 2005 食品中污染物限量[S]. 北京:中国标准出版社,2005.

收稿日期:2013-01-11

(张翠编辑 刘铁校对)