

柱前衍生化 气相色谱 质谱法测定细胞中的对 正壬基酚^{*}

高子¹ 鲜啟鸣¹ 韩晓冬² 潘旭萍² 冯建¹ 于红霞^{1**}

(1 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京, 210093;

2 南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室, 南京, 210093)

摘 要 采用柱前衍生化 气相色谱 质谱法测定染毒细胞以及细胞质中对 正壬基酚 (4-*n*-NP) 的含量, 并初步探讨了 4-*n*-NP 在细胞中的分布. 在不同介质中加标回收率在 76.5%—98.9% 之间. 利用本方法测定实际样品发现: 在浓度为 $10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 4-*n*-NP 溶液中暴露 12h, 10^5 个细胞中 4-*n*-NP 的含量分别为 21.0ng 和 43.0ng, 而相应的细胞质中 4-*n*-NP 的含量分别为 14.2ng 和 28.4ng, 显示有 67.6% 和 66.0% 的 4-*n*-NP 分布在细胞质中.

关键词 对 正壬基酚, 衍生化, 气相色谱 质谱, 细胞, 细胞质.

目前, 已有学者利用高效液相色谱 (HPLC)、液相色谱 质谱 (LC/MS) 和气相色谱 质谱 (GC/MS) 等手段测定天然水体^[1, 2]、生活污水^[3]和生物样品^[4]等复杂环境样品中的壬基酚 (NP). 但是很少有研究在细胞水平上进行 NP 的测定, 因此, 对 NP 在细胞中的作用机制及其剂量效应关系有待进一步开展, 曾经有人测定小鼠肝细胞染毒后细胞中 4-NP 的总含量^[5], 但没有进一步研究 4-NP 在染毒细胞内的分布情况.

本实验以对 正壬基酚 (4-*n*-NP, CAS No. 104-40-5) 作为模型化合物, 尝试采用柱前衍生化 气相色谱 质谱法测定染毒细胞中以及细胞质中的 4-*n*-NP 含量, 初步研究 4-*n*-NP 在细胞中的分布情况.

1 细胞的获取与预处理

雄性大鼠生殖细胞取自南京大学医学院免疫与生殖生物学实验室. 经 4-*n*-NP 的水溶液作用后, 用磷酸缓冲液洗涤, 在超声仪中超声破碎, 得到每毫升细胞个数为 10^6 个的细胞悬液.

细胞质提取步骤参照《医学细胞工程》^[6], 首先收集细胞悬液至离心管中, 补加 20ml 蔗糖 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 溶液 (ST 液), 再加入 2.67ml 聚乙酰胺吡咯烷酮的硅胶颗粒溶液 (Percoll 分离剂), 和 $40\text{ml } 2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖溶液, 充分混匀, 以 $18200\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20min. 离心后, 细胞膜在近管顶的 Percoll 层中, 保留下层清液. 吸出细胞膜薄层置于另一离心管中, 再补加 20ml ST 液、2.67ml Percoll 分离剂、0.39ml 蔗糖溶液和 $0.3\text{ml } 100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液, 以 $20600\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30min, 细胞膜从 Percoll 层中分离出来, DNA 沉至离心管底部, 收集中间清液. 将两次离心后收集的清液合并, 即得到细胞中的细胞质部分.

将细胞悬液和细胞质提取物以 $4000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10min, 去除悬浮物, 再用 $0.10\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸将上清液 pH 值调节到 2—3 之间, 加入约 20ml 正己烷, 振摇萃取, 离心提取上层有机相. 萃取共进行 3 次, 收集 3 次萃取液, 旋转蒸发近干, 加入 500ng 定量内标物对 正丁基酚 (4-*n*-BP), 小流量氮气吹至近干, 加入 $0.10\text{ml } \text{N}_2\text{O}$ 双 (三甲基硅烷基) 三氟乙酰胺 (BSTFA), 60℃ 水浴反应 30min, 用正己烷定容至 0.50ml, 冷藏于 -20℃ 下, 待测.

2 GC/MS 分析

Finnigan-GCQ 气相色谱质谱联用仪 (美国 Finnigan 公司), 配备惠普 DS-5 毛细管柱 ($30\text{m}\times 0.25\text{mm}\times 0.25\mu\text{m}$). 进样口温度 280℃, 不分流进样, 进样 $1\mu\text{l}$, 传输线温度 260℃, 离子源温度 210℃, 质量扫描范围 (m/z) 为 50—450, 载气为氦气. 升温程序如下: 初始温度 80℃, 以

2007 年 12 月 30 日收稿.

* 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (No. 20518002) 资助. ** 通讯联系人, E-mail: yuhx@nju.edu.cn

12 $\cdot \text{min}^{-1}$ 的速度上升至 220 , 保持 2min, 再以 15 $\cdot \text{min}^{-1}$ 的速度上升至 300 , 保持 10min.

样品采用全扫描 SCAN 模式分析, 根据化合物的保留时间和质谱图进行定性, 定量则在选择离子 SM 模式下进行, 选择 4-*n*-BP 衍生物和 4-*n*-NP 衍生物的特征离子 m/z 179, m/z 222 和 m/z 179, m/z 292 进行定量, 以 4-*n*-BP 衍生物为内标, 利用内标法定量.

3 衍生化时间的确定

在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下, 将 500ng 的 4-*n*-NP 和 500ng 的 4-*n*-BP 与衍生化试剂 BSTFA 分别进行 10, 20, 30 和 40min 的衍生化反应, 记录不同反应时间下 4-*n*-NP 和 4-*n*-BP 衍生物的峰面积, 发现衍生化反应产物的峰面积在前 30min 呈增加趋势, 而在 30min 后反应产物的峰面积未见有明显增加, 因此, 确定在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下的反应时间为 30min.

4 标准物的测定及标准曲线制作

在玻璃离心管中分别添加质量为 50, 100, 250, 500, 1000 和 2000ng 的 4-*n*-NP 标样, 再加入 500ng 内标 4-*n*-BP 和 0.10ml BSTFA, 在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下反应 30min 后定容至 0.50ml, GC/MS 分析. 图 1 展示了标样 (4-*n*-BP 和 4-*n*-NP 计算浓度分别为 1.0 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$) 的色谱图和质谱图, 从图 1 中可以看到, 在选择合适的特征离子后, 4-*n*-BP 衍生物 ($RT = 7.27\text{min}$) 和 4-*n*-NP 衍生物 ($RT = 12.48\text{min}$) 的峰型均良好, 且信噪比较高. 4-*n*-NP 标样衍生物的质谱可作为样品中 4-*n*-NP 定性分析的依据.

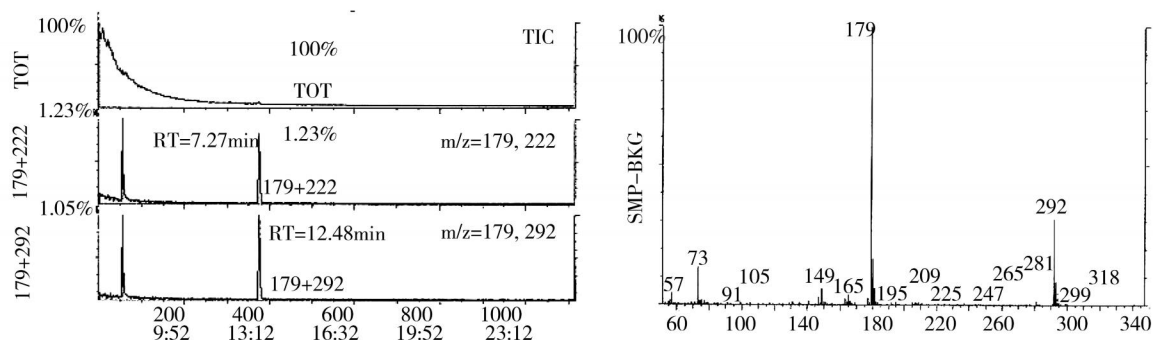


图 1 对正壬基酚标样衍生物的色谱图与质谱图

Fig. 1 Chromatogram and standard mass spectrum of silylated 4-*n*-nonylphenol

测定不同浓度下 4-*n*-NP 衍生物与 4-*n*-BP 衍生物峰面积的比值, 并根据 4-*n*-NP 和 4-*n*-BP 的质量比制作标准曲线. 结果显示, 4-*n*-NP 在浓度范围为 0.1—4 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 之间标准曲线的线性良好, R^2 达 0.995, 可以满足准确定量的要求.

5 回收率与检测限

在蒸馏水、细胞悬液和细胞质样品中, 分别添加 500ng 的 4-*n*-NP 标准品, 经过与样品相同的预处理, 测定方法的空白加标回收率和基质加标回收率, 并通过平行实验来考察方法的精密度. 结果表明, 在蒸馏水、细胞悬液和细胞质中, 4-*n*-NP 的加标回收率分别为 $98.9 \pm 13.4\%$ ($n = 5$), $88.7 \pm 6.8\%$ ($n = 6$) 和 $76.5 \pm 11.6\%$ ($n = 6$).

仪器的检测限是以空白的 3 倍信噪比来确定, 为 $5.7 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$; 定量检测限是以 10 倍信噪比来确定, 为 $19.1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

6 实际样品的测定

将培养获得的细胞暴露于浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 4-*n*-NP 溶液中, 暴露时间为 12h, 暴露完成后收集细胞, 经磷酸缓冲液洗涤去除 4-*n*-NP 溶液, 稀释得到每毫升含有 10^6 个细胞的悬液.

取 1ml 细胞悬液，将一半的细胞 (5×10^5 个) 超声破碎获得细胞悬液样品，按照前述步骤处理，测定细胞中 4-*n*-NP 的总含量；另一半细胞进行细胞质提取，按照同样的前处理方法测定该部分细胞的细胞质中 4-*n*-NP 的含量。结果表明，在浓度为 $10\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $20\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 4-*n*-NP 溶液暴露 12h 后，每 10^5 个细胞中 4-*n*-NP 的含量分别为 21.0ng 和 43.0ng，而相应的细胞质中 4-*n*-NP 的含量分别为 14.2ng 和 28.4ng (上述结果未经回收率校正)。

图 2 展示了以浓度为 $10\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 4-*n*-NP 溶液暴露 12h 的细胞 (a) 和细胞质 (b) 样品的色谱图，从图 2 可以看出，利用本方法测定细胞和细胞质中的 4-*n*-NP，能够得到理想的色谱图，通过选择特征离子可以有效地降低干扰，提高分析方法的灵敏度和准确性。

一般的细胞可分成细胞质以及其它非细胞质部分 (主要是细胞膜与细胞核)。根据前述的细胞质提取步骤，可将细胞质有效地从细胞中分离提取出来。再经过后续的萃取和衍生化等步骤，可以准确测定出细胞质中 4-*n*-NP 的含量。同时测定出细胞中 4-*n*-NP 的含量，则可以知道 4-*n*-NP 在细胞中的大概分布情况。由测定结果可以认为，在浓度为 $10\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $20\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 4-*n*-NP 溶液暴露 12h 后，整个细胞中分别有 67.6% (14.2/21.0) 和 66.0% (28.4/43.0) 的 4-*n*-NP 分布在细胞质中。由此可见，经过 4-*n*-NP 溶液暴露 12h 后，进入细胞的 4-*n*-NP 超过一半是分布在细胞质中。虽然本实验中暴露浓度增加一倍后细胞和细胞质中的 4-*n*-NP 含量也增加了一倍，但是在细胞质中 4-*n*-NP 和细胞中 4-*n*-NP 的比例基本保持不变。这说明在本实验中 4-*n*-NP 在细胞内的分布不受暴露浓度的影响。

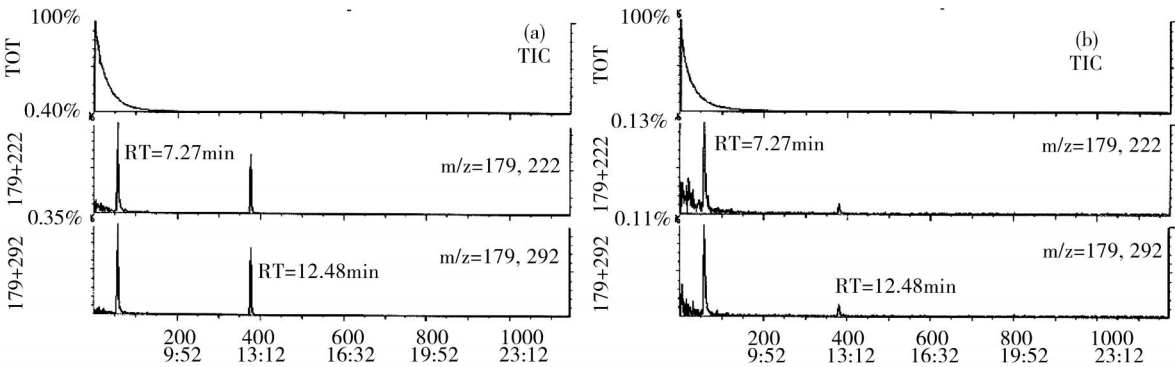


图 2 细胞 (a) 和细胞质 (b) 中对-壬基酚衍生物的总离子流色谱图和选择离子色谱图

Fig. 2 Total ion current chromatogram and selected ion monitoring chromatogram of silylated 4-*n*-nonylphenol in cell (a) and cytoplasm (b)

综上所述，本文建立了一种采用柱前衍生化 气相色谱/质谱法测定细胞和细胞质中 4-*n*-NP 含量的方法，在 $0.1\text{—}4\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ 浓度范围之间标准曲线线性良好，可以满足定量的要求。在蒸馏水、细胞和细胞质中加标回收率分别为 98.9%，88.7% 和 76.5%。

利用本方法测定实际样品，发现在 4-*n*-NP 浓度为 $10\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 和 $20\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的溶液中暴露 12h，有 67.6% 和 66.0% 的 4-*n*-NP 分布在细胞质中。

参 考 文 献

[1] Jin X L, Jiang G B, Huang G L et al, Determination of 4-Tert-octylphenol, 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Surface Waters from the Haihe River in Tianjin by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Selected Ion Monitoring [J]. *Chemosphere*, 2004, 56 (11) 1113—1119

[2] 邵兵, 胡建英, 杨敏, 高效液相色谱法测定水环境中壬基酚聚氧乙烯醚及其生物降解产物 [J]. *环境化学*, 2001, 20 (6) 600—605

[3] Loos R, Hanke G, Umlauf G et al, LC-MS/MS Analysis and Occurrence of Octyl- and Nonylphenol, Their Ethoxylates and Their Carboxylates in Belgian and Italian Textile Industry, Waste Water Treatment Plant Effluents and Surface Waters [J]. *Chemosphere*, 2007, 66 (4) 690—699

[4] Tsuda T, Suga K, Kaneda E et al, Determination of 4-Nonylphenol, Nonylphenol Monoethoxylate, Nonylphenol Diethoxylate and Other Alkylphenols in Fish and Shellfish by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [J]. *Journal of Chromatog-*

raphy B, 2000, 746 (2) 305—309

- [5] Muller S, Schmid P, Schlatter C, Distribution and Pharmacokinetics of Alkylphenolic Compounds in Primary Mouse Hepatocyte Cultures [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 1998, 6 (1) 45—48
- [6] 杨吉成, 宋礼华, 周建华等, 医学细胞工程 [M]. 上海: 交通大学出版社, 2003, 568—627

DETERMINATION OF NONYL PHENOL IN CELLS BY PRE-COLUMN DERIVATIZATION AND GAS CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY

GAO Zi-shen¹ XIAN Qi-ming¹ HAN Xiao-dong² PAN Xu-ping²
FENG Jian-fang¹ YU Hong-xia¹

(1 State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, 210093, China;
2 Immunology and Reproductive Biology Laboratory, Medical School, Nanjing University, Nanjing, 210093, China)

ABSTRACT

In order to study the distribution of 4-*n*-NP in cells, a pre-column derivatization method coupled with GC/MS was set up to analyze 4-*n*-NP quantitatively in cells and their cytoplasm. The spiked recoveries ranged from 76.5% to 98.9% for different mediums. After cells exposed to $10\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 4-*n*-NP solutions for 12 hours, the amount of 4-*n*-NP were 21.0 ng and 43.0 ng in 10^5 cells and 14.2 ng and 28.4 ng in cytoplasm of 10^5 cells, respectively. The results indicate that about 67.6% and 66.0% of 4-*n*-NP were in cells cytoplasm.

Keywords: 4-*n*-nonylphenol, derivatization, GC/MS, cell, cytoplasm.

赛默飞世尔科技推出 ToxSpec Analyzer ——用于毒物筛选的完整液质联用方案

2008年10月27日赛默飞世尔科技公司为临床毒理毒物筛选实验推出了完整的、使用简单、液质溶液剂低消耗的液质联用分析系统——Thermo Scientific ToxSpec™ Analyzer。ToxSpec™ Analyzer将硬件、软件和分析方法整合于一体,通过自动化毒物筛选显著地简化了毒理工作方案,增加了鉴定的可信度并且能让新手得出可信的结果。

ToxSpec™ Analyzer包含筛选方案方法的测试,其中包括了筛选的每个阶段,从样品的制备到分析、数据的采集、报告的输出。ToxSpec™ Analyzer CD包括:固相萃取样品方法的制备;LC/MS数据采集方法;化合物谱库;ToxD软件配置;推荐消耗品名单。

美国联邦航空管理局民用航空医学研究所化学研究员罗伯特约翰逊博士,在过去的八个月使用ToxD 1.0 (ToxSpec™ Analyzer产品的一部分)成功地筛选出未知物。

ToxSpec Analyzer每一方面的设计都是为了确保最大程度的易用性和灵活性。该ToxD软件只需要一个初始配置,然后在幕后集成,通过数据采集软件自动实施化合物的鉴定和报告的产生。根据实验的需要,ToxD软件能生成摘要,并且数据预览报告可以以PDF或者EXCEL的格式生成。

虽然操作简单,ToxSpec™ Analyzer也能满足最严格的实验室性能标准。赛默飞世尔科技在尿样基质中成功地筛选了谱库和分析物列表中的所有化合物,同时给出了检测限。

与传统的方法相比,将ToxSpec™ Analyzer LC/MS联用方法应用于毒物筛选能为研究人员提供更多的灵活性。使用ToxSpec™ Analyzer,研究人员可以根据实验的需要应用新的化合物,一个新药的发现随之而来的是巨大的经济效益。

(本刊讯)