

# 超高效液相色谱串联质谱检测尿液中 6种环境内分泌干扰物方法的建立与应用

彭凡立<sup>1</sup>, 吉文亮<sup>2</sup>, 彭丹红<sup>3</sup>, 朱峰<sup>2</sup>, 杨淼<sup>1</sup>, 刘冉<sup>1</sup>, 浦跃朴<sup>1</sup>, 尹立红<sup>1</sup>

**摘要:** [目的] 建立超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)检测人尿液中4种塑化剂代谢产物、双酚A(BPA)和壬基酚(NP)含量的方法,分析南京地区育龄期妇女对6种典型环境内分泌干扰物的暴露水平。[方法] 建立针对塑化剂代谢产物、BPA和NP的尿液样品前处理方法以及UPLC-MS/MS检测方法,考察方法的回收率和日内、日间精密度。用所建立的方法对南京地区120份育龄期妇女尿液样品中塑化剂代谢产物、BPA和4-n-NP进行定量分析。[结果] 4种塑化剂代谢产物、BPA和4-n-NP在1~100 μg/L范围内均呈线性关系良好( $r^2>0.998$ ),其中邻苯二甲酸单正丁酯(MBP)、邻苯二甲酸单异丁酯(MiBP)、邻苯二甲酸单苄酯(MBzP)和邻苯二甲酸单(2-乙基)己酯(MEHP)检测限均为0.1 μg/L。BPA和4-n-NP检测限为0.3 μg/L。固相萃取回收率均在92.3%~103.5%,日间及日内精密度均小于10%。育龄期妇女尿液中MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA和4-n-NP质量浓度中位数分别为5.04、2.10、0.42、5.24、1.32和1.47 μg/L。[结论] 本研究建立的尿液中塑化剂代谢产物、BPA和4-n-NP检测方法具有灵敏度高、定量准确的优势。南京地区育龄期妇女尿液中MBP、MiBP、MBzP、MEHP和BPA有较高检出率。

**关键词:** 塑化剂; 双酚A; 壬基酚; 代谢产物; 超高效液相色谱串联质谱; 尿液

**Establishment and Application of Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for Detecting Six Environmental Endocrine Disruptors in Urine** PENG Fan-li<sup>1</sup>, JI Wen-liang<sup>2</sup>, PENG Dan-hong<sup>3</sup>, ZHU Feng<sup>2</sup>, YANG Miao<sup>1</sup>, LIU Ran<sup>1</sup>, PU Yue-pu<sup>1</sup>, YIN Li-hong<sup>1</sup> (1.Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education/School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 2.Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210009, China; 3.Department of Obstetrics and Gynecology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China). Address correspondence to YIN Li-hong, E-mail: lhyin@seu.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

**Abstract:** [Objective] To establish a method based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to assess six kinds of environmental endocrine disruptors including four phthalate metabolites (MPAEs), bisphenol A (BPA), and nonylphenol (NP) in the urine of women of reproductive age in Nanjing. [Methods] Pretreatment and UPLC-MS/MS analytical method was established for MPAsEs, BPA, and NP. The accuracy, intra-day precision, and inter-day precision of the method were assessed. Then 120 urine samples collected from women of reproductive age in Nanjing were measured for concentrations of phthalate metabolites, BPA, and 4-n-NP. [Results] All the analytes were linear over the range of 1~100 μg/L ( $r^2>0.998$ ). The limits of detection were 0.1 μg/L for mono-n-butyl phthalate (MBP), mono-isobutyl phthalate (MiBP), mono-benzyl phthalate (MBzP), and mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), and 0.3 μg/L for BPA and 4-n-NP. The recoveries by solid phase extraction of all analytes ranged from 92.3% to 103.5%; the intra-day and inter-day precisions were all less than 10%. The median concentrations of MBP, MiBP, MBzP, MEHP, BPA, and 4-n-NP were 5.04, 2.10, 0.42, 5.24, 1.32, and 1.47 μg/L, respectively. [Conclusion] The sensitive and accurate method is suitable for the determination of MPAsEs, BPA and 4-n-NP in urine. Women of reproductive age present high positive rates of MBP, MiBP, MBzP, MEHP, and BPA.

**Key Words:** phthalate; bisphenol A; nonylphenol; metabolite; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; urine

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15717

[基金项目]国家自然科学基金(编号: 81273123)

[作者简介]彭凡立(1990—),男,硕士生;研究方向:环境与健康;E-mail: pengfanli@gmail.com

[通信作者]尹立红, E-mail: lhyin@seu.edu.cn

[作者单位]1.东南大学公共卫生学院,环境医学工程教育部重点实验室,江苏南京210009;2.江苏省疾病预防控制中心,江苏南京210009;3.东南大学附属中大医院妇产科,江苏南京210009

近年来,环境污染的严峻现实使人们逐渐发现环境有害物质对人体的危害,环境因素与生殖的关系越来越受到医学工作者的关注。在众多环境有害物质中,环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors)被认为是与生殖障碍、出生缺陷、发育异常、代谢紊乱有关<sup>[1]</sup>。现今关注育龄期妇女暴露于环境内分泌干扰物的研究数据极为缺乏<sup>[2]</sup>,环境内分泌干扰物与育龄期妇女生殖健康的关系将是今后研究方向之一。

塑化剂,学名邻苯二甲酸酯类,被广泛用于塑料容器、食品包装和个人护理用品等<sup>[3]</sup>。双酚A(bisphenol A, BPA)是制造聚碳酸脂、环氧树脂、抗氧化剂等的前体物质,广泛应用于杀真菌剂、染料及机械仪表、医疗器械、电讯器材、罐头内包装、食品包装材料与饮料容器等<sup>[4]</sup>。壬基酚(nonylphenol, NP)是一种新近认识的环境内分泌干扰物,属于酚类抗氧化剂,广泛用于化学工业,制备合成洗涤剂、表面活性剂、增湿剂、润滑油添加剂、增塑剂等<sup>[5]</sup>。研究报道,塑化剂、BPA和NP这些环境内分泌干扰物可能对人类生殖造成不良影响,如出生缺陷、内分泌干扰甚至癌症<sup>[4, 6-10]</sup>。

本研究建立了尿液中4种塑化剂代谢产物、BPA和NP的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)定量检测方法,探讨南京地区育龄期妇女对上述物质的暴露特征,为多种环境内分泌干扰物内暴露水平的检测提供了技术手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

UPLC-MS/MS(Thermo, 美国),自动固相萃取装置(北京普立泰科公司,中国),Milli-Q超纯水系统(默克,德国),ABS ELUT-Nexus(60 mg, 3 mL)固相萃取小柱(安捷伦,美国)。

邻苯二甲酸单正丁酯(mono-n-butyl phthalate, MBP)、邻苯二甲酸单异丁酯(mono-isobutyl phthalate, MiBP)、邻苯二甲酸单苄酯(mono-benzyl phthalate, MBzP)、邻苯二甲酸单(2-乙基)己酯(mono-2-ethylhexyl phthalate, MEHP)、BPA和4-n-NP标准品(Accustandard, 美国),氘代同位素内标D<sub>4</sub>-MBP、D<sub>4</sub>-MBzP、D<sub>4</sub>-MEHP和4-n-NP-D<sub>4</sub>(C/D/N, 加拿大),D<sub>16</sub>-BPA(D.R.E, 德国)。磷酸二氢钠、磷酸、甲酸、氨水和乙酸铵(分析纯;国药集团化学试剂有限公司,中国)。 $\beta$ -葡萄糖醛酸酯酶/硫酸酯酶(上海安谱科技公司,中

国)。甲醇和乙腈为色谱纯(默克,德国)。

### 1.2 尿样收集和空白样制备

选择南京市中大医院妇产科门诊及病区就诊的正常孕妇和经产妇共120例为研究对象。通过调查问卷收集个人基本信息,在获得患者知情同意的情况下,采集其尿液,-80℃冻存待用。研究对象纳入标准:20~40岁育龄期女性,至少育有一孩,或妊娠大于28周,在此之前无任何不良生殖结局。以超纯水作为空白样品。将MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA和4-n-NP这6种物质均在检测限以下的尿液样本混合,作为空白尿液,用于方法验证。

### 1.3 空白本底和溶液配制

由于塑化剂、BPA和NP在环境中广泛存在,可能导致实验环境高本底问题,故本实验中所有玻璃器皿在使用前均用甲醇和超纯水分别润洗两次,于120℃环境中烘干。采用超纯水作为空白样品,检测此空白样品在实验过程中各目标分析物的含量,作为空白本底扣除。固相萃取柱采用玻璃材质,所涉及试剂使用前测定空白值,满足要求方可使用。

分别称取每种标准品和同位素内标,溶解于甲醇中,配制质量浓度(下称浓度)为1 g/L的储备液,-20℃保存备用。吸取每种同位素内标储备液250 μL至50 mL容量瓶,甲醇稀释,得5 mg/L同位素内标混合溶液,-20℃保存备用。 $\beta$ -葡萄糖醛酸酯酶溶液配成200 U/mL,-20℃保存备用。配制0.14 mol/L的磷酸钠缓冲液,用磷酸调节pH至2。配制1 mmol/L的乙酸铵溶液备用。

### 1.4 样品前处理

尿样于室温下解冻后,吸取900 μL,加入40 μL同位素内标混合溶液(5 mg/L),20 μL  $\beta$ -葡萄糖醛酸酯酶/硫酸酯酶溶液和250 μL乙酸铵溶液,涡旋1 min,37℃水浴孵化120 min,每0.5 h取出涡旋1 min。孵化结束后,加入1 mL磷酸钠缓冲液(pH=2),然后使用固相萃取柱对尿液进行净化、浓缩。固相萃取柱使用前依次用2 mL乙腈和2 mL磷酸钠缓冲液活化,然后上样,用3 mL纯水淋洗,氮吹除水10 min,最后用1 mL的甲醇乙腈1:1混合液洗脱,收集洗脱液。洗脱液40℃水浴氮吹至干,用200 μL甲醇复溶,过滤,上机检测。

### 1.5 测定

1.5.1 色谱条件 色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH苯基柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm)及Vanguard预柱;

柱温: 30℃; 进样量 5 μL; 流动相: 检测塑化剂代谢产物为 0.1% 的甲酸水溶液(A)和甲醇(B), 梯度为 0~4 min, 30% B; 8 min, 40% B; 10 min, 50% B; 16~20 min, 70% B; 20.1~22 min, 30% B。检测 BPA 和 NP 流动相为 0.05% 氨水(A)和甲醇(B), 梯度为 0~2 min, 20% B; 6 min, 50% B; 8~12 min, 95% B; 12.1~14 min, 20% B。流动相流速均为 300 μL/min。

**1.5.2 质谱条件** 电喷雾电离源, 电离方式: ESI; 毛细管电压: 3000 V; 喷雾电压: 2600 V; 去溶剂温度: 350℃; 扫描方式: 多反应监测。

## 1.6 分析方法建立

**1.6.1 标准曲线** 用甲醇稀释 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的混标溶液并加入内标, 配成 7 个系列浓度(1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μg/L)的混标溶液。以目标分析物与内标峰面积比为纵坐标, 浓度为横坐标, 采用最小二乘法拟合标准曲线。

**1.6.2 精密度和加标回收率** 用混合尿液制备低和高 2 个浓度(10.0 和 100.0 μg/L)的尿液样本, 按照“1.4”方法, 将高、低两个浓度样品作为 1 组, 共 5 组, 每间隔 2 h 测定 1 组, 计算日内精密度和回收率; 按照“1.4”方法, 每隔 2 h 连续测 5 次, 计算日内精密度和回收率; 制备同样浓度的混合尿液样品各 5 个, 连续测定 5 d, 计算日间精密度和回收率。

**1.6.3 固相萃取回收率** 制备低、中、高 3 个浓度(5.0、20.0 和 100.0 μg/L)的尿液样本, 按照“1.4”方法, 进行测定; 空白尿样为不加标的混合尿液; 计算固相萃取回收率。

**1.6.4 定性依据** 采用保留时间和目标分析物特征离子对作为定性依据。目标分析物采用一个母离子和两个子离子, 满足欧盟质谱评分标准, 且实测离子对相对离子强度与理论值偏差不超过 15%。

## 1.7 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件对南京地区育龄期妇女尿液中 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的浓度进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线和检测限

混标中 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的标准曲线相关系数均大于 0.99, 线性良好。尿液样品中分析物峰信噪比为 3 时的浓度定为该物质的检测限,

参照 HJ 168—2010《环境监测 分析方法标准制修订技术导则》要求计算得到 MBP、MiBP、MBzP 和 MEHP 检测限为 0.1 μg/L, BPA 和 4-n-NP 检测限为 0.3 μg/L。6 种分析物分离谱图见图 1。

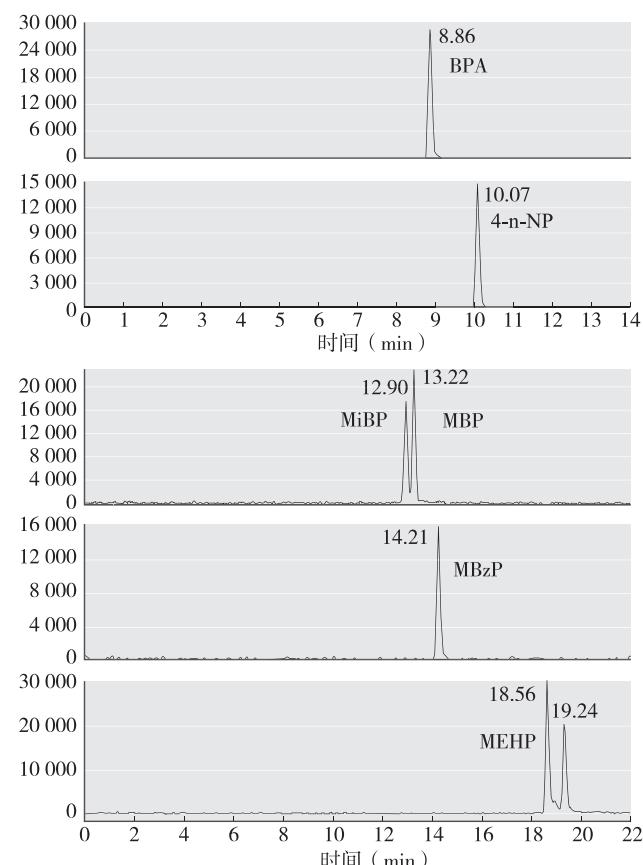


图 1 6 种目标分析物色谱图

### 2.2 日内和日间误差

6 种分析物均设置低和高 2 个浓度(10.0 和 100.0 μg/L)的质控, 回收率范围在 89.1%~107.1%, 日内和日间误差结果见表 1。

表 1 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的日内和日间误差

化合物	加标浓度 (μg/L)	精密度(%)		回收率(%)	
		日内(n=5)	日间(n=5)	日内(n=5)	日间(n=5)
MBP	10.0	3.4	5.5	102.8	95.6
	100.0	3.0	7.8	94.4	97.6
MiBP	10.0	4.1	5.8	106.6	90.2
	100.0	4.2	8.8	100.3	94.1
MBzP	10.0	2.4	5.2	104.1	89.1
	100.0	3.9	4.4	101.9	104.7
MEHP	10.0	6.4	8.1	94.7	90.3
	100.0	5.5	7.8	101.5	107.1
BPA	10.0	6.1	7.2	96.4	103.8
	100.0	6.9	6.1	98.7	94.1
4-n-NP	10.0	6.1	7.8	99.8	107.0
	100.0	5.2	7.7	106.0	98.4

### 2.3 固相萃取回收率

MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 混标溶液制备低、中、高 3 个浓度( 5.0, 20.0 和 100.0 μg/L ), 回收率范围在 92.3%~103.5%, 平均误差小于 10%。结果显示, ABS ELUT-Nexus 固相萃取柱适合同时提取这 6 种分析物。见表 2。

**表 2 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的固相萃取回收率**

化合物	5.0 μg/L (n=6)		20.0 μg/L (n=6)		100.0 μg/L (n=6)	
	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
MBP	96.8	5.1	101.5	3.4	92.8	2.8
MiBP	97.5	7.8	100.0	6.3	90.4	4.2
MBzP	94.7	9.2	97.3	9.3	98.4	3.9
MEHP	92.3	6.3	94.5	4.2	103.5	4.5
BPA	93.5	9.9	101.4	2.5	94.6	4.0
4-n-NP	101.2	4.2	96.1	8.3	98.4	8.6

### 2.4 实际样品分析

对 120 份尿液样本进行检测, 由于南京地区育龄期人群尿液中 6 种分析物浓度呈偏态分布, 除均数外另采用中位数表示平均浓度。6 种分析物中, MBP、MiBP、MBzP、MEHP 和 BPA 有较高的检出率。见表 3。

**表 3 南京地区育龄期人群尿液中 6 种分析物水平 ( μg/L )**

化合物	均数 ± 标准差	中位数	浓度范围	检出率 (%)
MBP	8.68 ± 11.81	5.04	< 检出限 ~74.5	96.7
MiBP	3.03 ± 3.22	2.1	< 检出限 ~18.0	89.2
MBzP	0.77 ± 0.93	0.42	< 检出限 ~5.9	81.7
MEHP	6.61 ± 4.35	5.24	1.3~23.6	100.0
BPA	2.07 ± 2.44	1.32	< 检出限 ~11.3	73.3
4-n-NP	1.65 ± 1.53	1.47	< 检出限 ~6.9	66.7

### 3 讨论

由于塑化剂代谢产物、BPA 和 NP 在尿液样本中的浓度较低, 获得高灵敏度、准确度和精密度的检测方法是相关方法学研究方向。本研究仅通过 900 μL 尿液样本便获得 MBP、MiBP、MBzP 和 MEHP 0.1 μg/L 以及 BPA 和 4-n-NP 0.3 μg/L 的高灵敏度, 且方法具有较好的准确度和精密度。通过检测人群尿样 6 种物质的浓度, 证明此方法适用于大规模尿液样本中 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的检测, 能获得较好的准确度和重现性。

实验结果显示, 在酸性流动相的环境下, BPA 和 4-n-NP 的响应强度受到抑制; 而在碱性流动相条件下, 塑化剂代谢产物有色谱不保留的现象, 无法将 6 种分析物同时纳入一种分析方法。故将 BPA 和 NP 在碱性流动相的条件下检测, 塑化剂代谢产物在酸性流动相条件下检测, 分别建立了两种色谱方法, 保证了各分析方法对每种分析物均能获得良好的灵敏度和准确度。为使同分异构体 MBP 和 MiBP 得到色谱分离, 在试验了众多流动相梯度条件后, 选择了 70% 的甲酸水溶液和 30% 的甲醇, 并放缓梯度变化速率, 可以得到满意的分离结果, 从而避免假阳性结果的产生, 虽然该方法分析时间达 22 min, 但仍有可优化的余地, 后期研究将在保证 MBP 和 MiBP 色谱分离的条件下缩短该方法分析时长。

120 例尿液样本的检测结果显示, MBP、MiBP、MBzP、MEHP 和 BPA 有较高的检出率, 可见南京地区育龄期妇女对该 5 类物质的暴露较为普遍。

南京地区 120 例育龄期妇女尿液 BPA 中位浓度与文献报道的美国育龄期妇女尿液 BPA 浓度相似<sup>[11]</sup>。本研究尿液样本中 MBP、MiBP 和 MBzP 的浓度比国外怀孕人群中尿液含量低<sup>[12]</sup>。对于 MEHP, 本研究人群的暴露水平高于国外类似人群<sup>[13]</sup>。4-n-NP 中位浓度低于普通女性暴露水平<sup>[14]</sup>。与另一项检测国内妇女塑化剂内暴露水平的研究相比<sup>[15]</sup>, 本研究 MBP 和 MiBP 中位浓度远低于该人群, MBzP 中位浓度相似, 而 MEHP 内暴露水平达该研究中位水平的 3 倍。生活习惯的不同以及地域差异将决定人群对于不同环境内分泌干扰物有着不同的暴露途径和频率, 这提示对于某一地区具有相似特征人群的内暴露研究会有更可信的结果。后期研究还应加大研究人群数量, 以更加全面、真实地反映南京地区育龄期妇女对上述几种典型环境内分泌干扰物的暴露特征。

本研究所建立的分析方法适用于尿液中 MBP、MiBP、MBzP、MEHP、BPA 和 4-n-NP 的检测, 本方法与一般塑化剂代谢产物检测方法相比具有取样量小、灵敏度高、准确性好等特点, 并着重解决了以往塑化剂代谢产物检测方法忽略的 MBP 和 MiBP 同分异构体色谱分离的问题, 避免假阳性结果的产生, 使分析结果准确可靠; 同时将塑化剂代谢产物与 BPA、NP 分开检测, 使各自分析方法在最佳条件下运行。

检测结果表明, 南京地区育龄期妇女尿液中 MBP、MiBP、MBzP、MEHP 和 BPA 有较高检出率。研

究结果对系统研究环境内分泌干扰物与育龄期妇女生殖健康的关系具有重要的参考价值。本课题组将在本研究基础上,进一步扩大样本量,增加其他的相关重要检测指标,为环境内分泌干扰物影响人类健康提供更可靠的生物监测基础。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

## 参考文献

- [ 1 ] 赵利霞, 林金明. 环境内分泌干扰物分析方法的研究与进展 [J]. 分析试验室, 2006, 25( 2 ): 110-122.
- [ 2 ] Herrero L, Calvarro S, Fernández M A, et al. Feasibility of ultra-high performance liquid and gas chromatography coupled to mass spectrometry for accurate determination of primary and secondary phthalate metabolites in urine samples [J]. Anal Chim Acta, 2015, 853: 625-636.
- [ 3 ] Arbuckle TE, Davis K, Marro L, et al. Phthalate and bisphenol A exposure among pregnant women in Canada-results from the MIREC study [J]. Environ Int, 2014, 68: 55-65.
- [ 4 ] Asimakopoulos A G, Thomaidis N S, Koupparis M A. Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol [J]. Toxicol Lett, 2012, 210( 2 ): 141-154.
- [ 5 ] 肖晶. 双酚A和烷基酚的检测与暴露评估 [M]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2008.
- [ 6 ] Mankidy R, Wiseman S, Ma H, et al. Biological impact of phthalates [J]. Toxicol Lett, 2013, 217( 1 ): 50-58.
- [ 7 ] Ventrice P, Ventrice D, Russo E, et al. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity [J]. Environ Toxicol Phar, 2013, 36( 1 ): 88-96.
- [ 8 ] Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, et al. Human exposure to bisphenol A (BPA) [J]. Reprod Toxicol, 2007, 24( 2 ): 139-177.
- [ 9 ] Dekant W, Völkel W. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures [J]. Toxicol Appl Pharm, 2008, 228( 1 ): 114-134.
- [ 10 ] Lenie S, Cortvriendt R, Eichenlaub-Ritter U, et al. Continuous exposure to bisphenol A during *in vitro* follicular development induces meiotic abnormalities [J]. Mutat Res, 2008, 651( 1/2 ): 71-81.
- [ 11 ] Mortensen M E, Calafat A M, Ye X, et al. Urinary concentrations of environmental phenols in pregnant women in a pilot study of the National Children's Study [J]. Environ Res, 2014, 129: 32-38.
- [ 12 ] Casas L, Fernández M F, Llop S, et al. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children [J]. Environ Int, 2011, 37( 5 ): 858-866.
- [ 13 ] Adibi J J, Whyatt R M, Williams P L, et al. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples [J]. Environ Health Persp, 2008, 116( 4 ): 467-473.
- [ 14 ] Zhou F, Zhang L, Liu A, et al. Measurement of phenolic environmental estrogens in human urine samples by HPLC-MS/MS and primary discussion the possible linkage with uterine leiomyoma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2013, 938: 80-85.
- [ 15 ] Guo Y, Wu Q, Kannan K. Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures [J]. Environ Int, 2011, 37( 5 ): 893-898.

(收稿日期: 2015-12-21)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 陶黎纳)