

doi: 10.12452/j.fxcxb.25061601

固相支撑液液萃取/超高效液相色谱-串联质谱法 测定尿液中30种内分泌干扰物

张艳, 曲良娇, 凌莉, 梁素丹, 吴和岩, 黄文燕*

(珠海市疾病预防控制中心, 广东 珠海 519060)

摘要: 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)结合固相支撑液液萃取(SLE), 建立了同时测定尿液中30种内分泌干扰物(EDCs)的分析方法, 包括9种对羟基苯甲酸酯、9种双酚类化合物、10种二苯甲酮类化合物及2种抗菌剂。尿液经酶解和SLE柱净化后, 以0.05%乙酸溶液-甲醇为流动相, 在Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱上分离, 选择电喷雾(ESI)正负离子同时扫描、多反应监测(MRM)模式下采集信号, 内标法定量。30种EDCs在0.10~80 μg/L质量浓度范围内线性关系良好。尿液中30种目标物的加标回收率为86.9%~127%, 日内精密度为1.0%~8.7%, 日间精密度为1.1%~8.2%, 检出限(LOD)为0.003~0.094 μg/L, 定量下限(LOQ)为0.009~0.313 μg/L。应用该方法对150份尿样进行检测, 共检出23种EDCs, 检出率为0.7%~100%, 其中对羟基苯甲酸甲酯(MeP)的检出率最高(100%), 其次为4-羟基二苯甲酮(4-OHBP, 96.7%)和双酚A(BPA, 94.7%)。该方法简便、灵敏、准确, 适用于人群尿液中多种EDCs的高通量筛查和定量分析。

关键词: 内分泌干扰物; 超高效液相色谱-串联质谱; 尿液; 固相支撑液液萃取

中图分类号: O657.7; O657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)01-0088-09

Determination of 30 Endocrine Disrupting Chemicals in Urine by Solid Supported Liquid-Liquid Extraction Coupled with Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Yan, QU Liang-jiao, LING Li, LIANG Su-dan, WU He-yan, HUANG Wen-yan*

(Zhuhai Center for Disease Control and Prevention, Zhuhai 519060, China)

Abstract: A method was developed for simultaneous determination of 30 endocrine disrupting chemicals(EDCs) in urine. The target compounds detected included 9 parabens, 9 bisphenols, 10 benzo-phenones, and 2 antimicrobials. The method was based on solid supported liquid-liquid extraction (SLE) and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS). Urine sample was first treated with enzyme, then purified on a SLE column. The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column with 0.05% acetic acid aqueous solution and methanol as the mobile phase. The electrospray ion source (ESI) was operated in positive and negative ion switching scan. The detection was performed in multiple reaction monitoring(MRM) mode. Internal standard method was applied for quantitative analysis. The method yielded good linearity in the range level of 0.10~80 μg/L. The spiked recoveries of target compounds ranged from 86.9% to 127%. The relative standard deviations(RSDs) of intra-day and inter-day were 1.0%~8.7% and 1.1%~8.2%, respectively. The detection limits(LOD) and quantification limits(LOQ) of the method were 0.003~0.094 μg/L and 0.009~0.313 μg/L, respectively. The proposed method was applied to detect the target EDCs in 150 urine samples, and a total of 23 EDCs were detected, with a detection rate ranging from 0.7% to 100%. Among them, the detection rate of methylparaben (MeP) was the highest (100%), followed by 4-hydroxybenzophenone (4-OHBP, 96.7%) and bisphenol A(BPA, 94.7%). The developed method is easy to operate, sensitive, and accurate, and is suitable for high-throughput screening and quantitative analysis of EDCs in human

收稿日期: 2025-06-16; 修回日期: 2025-08-21

基金项目: 珠海市社会发展领域科技计划项目(2220004000115)

* 通讯作者: 黄文燕, 硕士, 主任医师, 研究方向: 职业卫生, E-mail: hwy2008@163.com

网络首发日期: 2025-12-01

urine.

Key words: endocrine disrupting chemicals; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); urine; solid supported liquid-liquid extraction (SLE)

内分泌干扰物(EDCs)是一类能干扰生物体内分泌系统的外源性物质^[1-2]。双酚、对羟基苯甲酸酯、二苯甲酮类化合物和抗菌剂是典型的EDCs^[3-8], 广泛用于建筑材料、食品包装、医疗用品、个人护理用品、清洁剂等产品中。这类物质具有极高的化学稳定性, 难以降解, 导致它们广泛存在于环境中, 可经摄入、吸入或皮肤接触进入人体并在体内蓄积, 对人类造成严重危害。研究表明, EDCs暴露会影响机体的内分泌、免疫、生殖及神经系统功能^[9-13], 其暴露风险已引起了全球的广泛关注。对人体生物样品中的EDCs进行监测是评价EDCs暴露的重要手段。由于尿液中EDCs的含量可以反映多种暴露途径的综合影响, 尿液被广泛用作EDCs生物监测的首选基质。EDCs种类繁多, 性质各异, 在开展人体生物监测时, 为获得多种EDCs的内暴露数据, 通常需对生物样品进行分类检测, 因此对样品量的需求较大, 检测工作繁重。此外, 出于伦理限制以及样本储存相关的因素考虑, 在人群研究中生物样本的获取变得越来越困难。如何在有限的样品量中获取尽可能多的人群暴露信息是人体生物监测面临的挑战。

目前, EDCs的检测以质谱技术为主^[14], 包括气相色谱-质谱联用(GC-MS)^[15-16]和液相色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)^[17-27], 尽管GC-MS具有性能稳定、重复性好、无离子抑制效应等优点, 但存在衍生过程繁琐耗时、试剂毒性大、分析时间长等不足, 并不适用于大规模生物监测。LC-MS/MS技术凭借其卓越的灵敏度和选择性, 目前已成为生物基质中EDCs分析的首选方法。尽管EDCs检测技术研究取得了显著进展, 但目前尚无生物样本中EDCs检测的国家标准方法。

生物样品基质复杂, 样品前处理是EDCs检测方法开发的难点, 急需可靠、简便、基质效应低、回收率高的提取方法。目前, 生物样品的提取技术主要有液液萃取(LLE)^[18-21]和固相萃取(SPE)^[22-27]。固相支撑液液萃取(SLE)^[28-29]以传统液液萃取原理为基础, 结合固相萃取支撑体易于相分离的特点, 采用硅藻土等惰性多孔吸附剂作为固体支撑材料, 水性样本被吸附于支撑材料表面, 当与水不混溶的有机相流过固定相时, 两相界面处产生浓度差, 促使目标物被高效萃取到溶剂中, 即可完成目标物的提取净化。SLE克服了LLE中常见的易乳化、溶剂用量大的缺陷, 具有样品量小、基质效应低、易于实现自动化的优势。在SLE处理中, 生物样本无需除蛋白, 可直接转移到SLE小柱中, 且无需活化和淋洗, 操作步骤仅需上样、静置和洗脱, 其方法开发简单, 分析效率高, 尤其适合生物基质中痕量物质的检测^[30-31]。

本文旨在开发一种基于SLE前处理结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)的分析方法, 用于同时检测人尿中30种EDCs, 包括9种对羟基苯甲酸酯、9种双酚类化合物、10种二苯甲酮类化合物以及2种抗菌剂。实验比较了不同洗脱溶剂和缓冲溶液pH值对样品净化的影响, 优化了色谱分离条件, 对方法性能参数进行了验证, 并将方法成功应用于150份人群尿液样本的检测。该方法具有高效、可靠的特点, 实现了复杂基质中多类别EDCs的同时提取净化与准确定量, 为人群EDCs暴露评估提供了技术参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC I-CLASS-Plus型超高效液相色谱仪(美国Waters公司); SCIEX TRIPLE QUAD™ 6500+三重四极杆质谱仪(美国Sciex公司); Extrahera全自动样品前处理系统(瑞典Biotage公司); 浓缩仪(瑞典Biotage公司); Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱(美国Waters公司); ISOLUTE SLE 1 mL柱(北京绿棉科技有限公司); 电热恒温水浴锅(德国Mettler公司); Milli-Q Advantage A10纯水机(美国Millipore公司); 涡旋振荡器(德国IKA公司); 电子天平(德国Sartorius公司)。

30种目标化合物及9种内标的基本信息列于表1, 标准品(纯度均大于98%)购自上海安谱公司。甲醇、乙腈(MS级, 德国Merck公司), 乙酸铵(色谱纯, 德国Merck公司); 乙酸乙酯、环己烷、二氯甲

烷、三氯甲烷(色谱纯,德国 Merck 公司),乙酸、 β -葡萄糖醛酸酶(>100 000 U/mL,上海安谱公司);人工尿液(北京汇智泰康医药技术有限公司)。

本研究已通过珠海市疾病预防控制中心伦理委员会批准(批准号:珠疾控伦理[2021]2号)。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取适量的 30 种 EDC 及内标标准品,用甲醇溶解,得到 1.0 mg/mL 的单标溶液。分别吸取各物质的单标溶液适量,用甲醇配制成 5.0 μ g/mL 的混合标准中间液。取各内标的单标溶液适量,用甲醇稀释成 5.0 μ g/mL 的混合内标中间液。再用甲醇-水(1:1,体积比)逐级稀释,得到质量浓度为 0.10、0.50、2.0、5.0、10、20、40、80 μ g/L 的标准系列溶液,其中内标的质量浓度为 10 μ g/L。

1.3 样品前处理

尿样采集后于-80 $^{\circ}$ C 保存。实验前将尿液转移至 4 $^{\circ}$ C 解冻过夜,然后取出恢复至室温,涡旋混匀。取 0.5 mL 尿液,依次加入 20 μ L 混合内标溶液(250 μ g/L)、0.3 mL 乙酸铵缓冲溶液(1 mol/L, pH 5.0)、20 μ L β -葡萄糖醛酸酶,酶活力相当于 4 000 U/mL 尿样,涡旋混匀后,置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中避光酶解过夜,然后加入 0.8 mL 异丙醇-乙酸乙酯溶液(1:3,体积比),充分混匀。将样品加载至 SLE 柱上,同时收集初始流出液,静置 5 min,分 2 次共加入 5 mL 乙酸乙酯进行洗脱,合并洗脱液和初始流出液,浓缩至近干。用 0.5 mL 甲醇-水(1:1,体积比)复溶样品,涡旋混匀,待测。

1.4 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μ m),柱温 40 $^{\circ}$ C。流动相:A 为 0.05% 乙酸溶液, B 为甲醇。流速 0.3 mL/min。梯度洗脱:0~1.5 min, 10%~30% B; 1.5~14 min, 30%~70% B; 14~17 min, 70%~95% B; 17~19 min, 95% B, 19.1 min 回到初始比例。进样量 5 μ L。

1.5 质谱条件

离子源:电喷雾电离源(ESI)。二苯甲酮、二苯甲酮-3、二苯甲酮-10 和三氯卡班采用 ESI⁺, 喷雾电压 4 500 V; 其余 26 种目标物采用 ESI⁻, 喷雾电压为-4 500 V; 加热气 3.8 $\times$ 10⁵ Pa; 碰撞气 6.2 $\times$ 10⁴ Pa; 气帘气 2.4 $\times$ 10⁵ Pa; 雾化气 3.8 $\times$ 10⁵ Pa; 温度 550 $^{\circ}$ C; 多反应监测(MRM)模式扫描。30 种 EDCs 及内标的质谱参数见表 1。

表 1 30 种 EDCs 及内标的质谱参数
Table 1 MS parameters for 30 EDCs and the internal standards

Analyte	Abb.	t_R /min	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	DP/V	CE/eV	Internal standard
Methyl paraben(对羟基苯甲酸甲酯)	MeP	4.72	150.9	92.0 ⁺ , 135.9	-70, -70	-27, -19	MeP-D ₄
Ethyl paraben(对羟基苯甲酸乙酯)	EtP	6.78	165.0	92.0 ⁺ , 137.0	-80, -80	-28, -18	EtP-D ₄
Isopropyl paraben(对羟基苯甲酸异丙酯)	IPP	8.71	179.0	91.9 ⁺ , 136.9	-75, -75	-35, -21	PrP-D ₄
Propyl paraben(对羟基苯甲酸丙酯)	PrP	9.11	179.0	91.9 ⁺ , 135.8	-75, -75	-20, -30	PrP-D ₄
Isobutyl paraben(对羟基苯甲酸异丁酯)	IBP	11.10	193.0	91.9 ⁺ , 135.8	-75, -75	-33, -22	BzP- ¹³ C ₆
Butyl paraben(对羟基苯甲酸丁酯)	BuP	11.30	193.0	91.9 ⁺ , 135.8	-75, -75	-33, -22	BzP- ¹³ C ₆
Benzyl paraben(对羟基苯甲酸苄酯)	BzP	11.36	227.0	92.0 ⁺ , 135.9	-80, -80	-36, -20	BzP- ¹³ C ₆
Methyl protocatechuuate(3, 4-二羟基苯甲酸甲酯)	MPA	3.42	167.0	108.0 ⁺ , 152.0	-60, -60	-27, -18	MeP-D ₄
Ethyl protocatechuuate(3, 4-二羟基苯甲酸乙酯)	EPA	5.06	181.0	107.9 ⁺ , 153.1	-75, -75	-31, -22	EtP-D ₄
Bisphenol F(双酚 F)	BPF	7.18	199.0	93.0 ⁺ , 105.0	-90, -90	-28, -28	BPA-D ₄
Bisphenol A(双酚 A)	BPA	9.80	227.1	212.1 ⁺ , 133.0	-80, -80	-24, -33	BPA-D ₄
Bisphenol B(双酚 B)	BPB	11.42	241.0	212.0 ⁺ , 147.0	-110, -110	-26, -36	BPA-D ₄
Bisphenol S(双酚 S)	BPS	4.05	248.9	108.0 ⁺ , 91.9	-100, -100	-37, -48	BPS- ¹³ C ₁₂
Bisphenol Z(双酚 Z)	BPZ	13.28	267.0	173.1 ⁺ , 223.0	-160, -160	-36, -41	BPA-D ₄
Bisphenol AP(双酚 AP)	BPAP	12.48	288.9	274.2 ⁺ , 195.2	-100, -100	-28, -38	BPA-D ₄
Bisphenol AF(双酚 AF)	BPAF	12.51	335.0	265.1 ⁺ , 69.0	-85, -85	-31, -62	BPA-D ₄
Bisphenol P(双酚 P)	BPP	16.04	345.1	330.0 ⁺ , 132.9	-120, -120	-38, -40	BPA-D ₄
Tetrabromobisphenol A(四溴双酚 A)	TBBPA	16.14	542.6	445.6 ⁺ , 417.5	-130, -130	-53, -41	TCS-D ₃
Benzophenone(二苯甲酮)	BP	11.10	183.1	105.0 ⁺ , 77.0	70, 70	22, 48	BP-1 D ₅
4-Hydroxybenzophenone(4-羟基二苯甲酮)	4-OHBP	8.36	197.0	92.0 ⁺ , 120.0	-106, -106	-39, -32	BP-1 D ₅
Benzophenone-1(二苯酮-1)	BP-1	10.01	213.0	91.0 ⁺ , 135.0	-90, -90	-34, -26	BP-1 D ₅
Benzophenone-2(二苯酮-2)	BP-2	5.91	245.0	135.0 ⁺ , 109.0	-70, -70	-20, -28	BP-1 D ₅
Benzophenone-3(二苯酮-3)	BP-3	13.13	229.0	151.2 ⁺ , 105.1	70, 70	27, 26	BP-3 D ₅
Benzophenone-5(二苯酮-5)	BP-5	5.93	307.0	211.0 ⁺ , 227.0	-100, -100	-48, -31	BP-1 D ₅

(续表1)

Analyte	Abb.	t_R /min	Precursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	DP/V	CE/eV	Internal standard
Benzophenone-6 (二苯酮-6)	BP-6	12.49	273.1	123.1 [*] , 229.1	-80, -80	-23, -18	BP-3 D ₅
Benzophenone-7 (二苯酮-7)	BP-7	14.38	231.1, 233.0	121.0 [*] , 121.0	-70, -80	-28, -28	BP-3 D ₅
Benzophenone-8 (二苯酮-8)	BP-8	11.00	243.0	123.0 [*] , 93.0	-70, -70	-35, -24	BP-1 D ₅
benzophenone-10 (二苯酮-10)	BP-10	14.86	243.2	151.1 [*] , 118.9	80, 80	27, 26	BP-3 D ₅
Triclosan(三氯生)	TCS	16.04	287.0, 289.0	35.0 [*] , 35.0	-70, -70	-37, -37	TCS-D ₃
Triclocarben(三氯卡班)	TCC	15.78	315.1	126.8 [*] , 92.9	100, 100	53, 53	TCS-D ₃
Internal standard	MeP-D ₄	4.65	155.0	96.0	-60	-30	-
	EtP-D ₄	6.71	169.0	96.0	-70	-33	-
	PrP-D ₄	9.04	183.0	95.9	-60	-30	-
	BzP- ¹³ C ₆	11.34	233.0	98.0	-60	-34	-
	BPA-D ₄	9.75	231.0	216.0	-80	-28	-
	BPS- ¹³ C ₁₂	4.04	261.0	114.0	-100	-36	-
	BP-1 D ₅	9.90	218.0	91.0	-100	-41	-
	BP-3 D ₅	13.05	234.0	151.2	60	27	-
	TCS-D ₃	16.00	291.9	35.0	-70	-42	-

*: quantitative ion

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

使用针泵连续进样标准溶液, 通过比较发现BP、BP-3、BP-10和TCC在正离子模式下的响应高于负离子模式, 宜采用正离子模式, 而其余目标物在负模式下的响应更优, 宜采用负离子模式进行检测。然后通过全扫描和产物离子扫描模式, 对质谱参数进行优化, 使母离子及特征子离子的信号强度达到最佳。实验对离子源温度(200、250、350、450、550 °C)进行了优化, 发现TCS的响应先随温度升高而增加, 然后减少, 在350 °C下的响应最高, 其他组分的响应随温度升高而增加。还比较了各物质在不同喷雾电压(2 500、3 500、4 500 V)下的响应, 结果显示, 各组分的响应随喷雾电压的升高而增加。此外对加热气、碰撞气、气帘气、喷雾气进行了优化, 确定质谱条件如“1.5”所示。

2.2 色谱条件优化

本研究对比了Acquity UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、Acquity UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)和Acquity UPLC CSH C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)3种常见色谱柱对30种EDCs的分离性能。由于IPP和PrP、IBP和BuP两对同分异构体具有相同的特征离子对, 色谱分离是实现准确定量的关键。结果显示, BEH C₁₈柱展现出最佳的分离效果, HSS T3柱次之, 而CSH C₁₈柱的分离效果相对较差。在BEH C₁₈柱上, 除MPA、EPA和BP有拖尾外, 其余27种组分均可得到满意的色谱分离效果; 当采用HSS T3柱时, MPA、EPA和BP有拖尾, BP-5出现了严重的色谱峰前沿, IBP和BuP分离不完全, 其余24种组分的分离效果满意; 当采用CSH C₁₈柱时, MPA、EPA几乎无保留, IBP和BuP分离不完全, 二苯甲酮类物质(如BP、BP-3、BP-6、BP-8和BP-10)出现拖尾, 大多数化合物在该柱上的响应低于前两种色谱柱。因此选择BEH C₁₈柱作为分析柱。

在流动相优化实验中, 考察了乙腈和甲醇两种有机溶剂, 以及不同水相(纯水、0.05%甲酸、0.05%乙酸、5 mmol/L乙酸铵溶液)对目标物分离效果的影响。实验表明, 两种有机溶剂下的质谱响应强度相近, 但甲醇体系下的保留时间更长, 对同分异构体的分离效果更佳。当采用纯水作为水相时, MPA和EPA的色谱峰存在拖尾现象, 其余组分均可得到满意的峰形和质谱响应。当水相为0.05%甲酸时, BPF、BPA、BPB、BPZ、BPAP无响应, BPP和TBBPA的响应弱, 甲酸对除BPS和BPAF外的双酚类化合物具有明显的离子化抑制作用; 其余组分均可获得满意的色谱分离和质谱响应。当采用0.05%乙酸作为水相时, 所有组分均可得到对称尖锐的色谱峰, 且质谱响应强。MPA和EPA在5 mmol/L乙酸铵体系下无响应。进一步考察不同乙酸浓度(0.025%、0.05%和0.1%)对色谱分离的影响发现, 0.05%乙酸水溶液的分离效果和响应强度明显优于0.025%乙酸水溶液, 但随着乙酸浓度的升高, 目标物的质

谱信号强度呈下降趋势,且同分异构体的峰分离度降低,可能是由于过量的酸抑制了目标化合物的离子化效率,同时影响了它们在色谱柱上的保留行为,导致分离效果变差。因此选择0.05%乙酸溶液-甲醇为流动相。在优化的色谱条件下,30种EDCs(10.0 $\mu\text{g/L}$)的色谱图见图1。

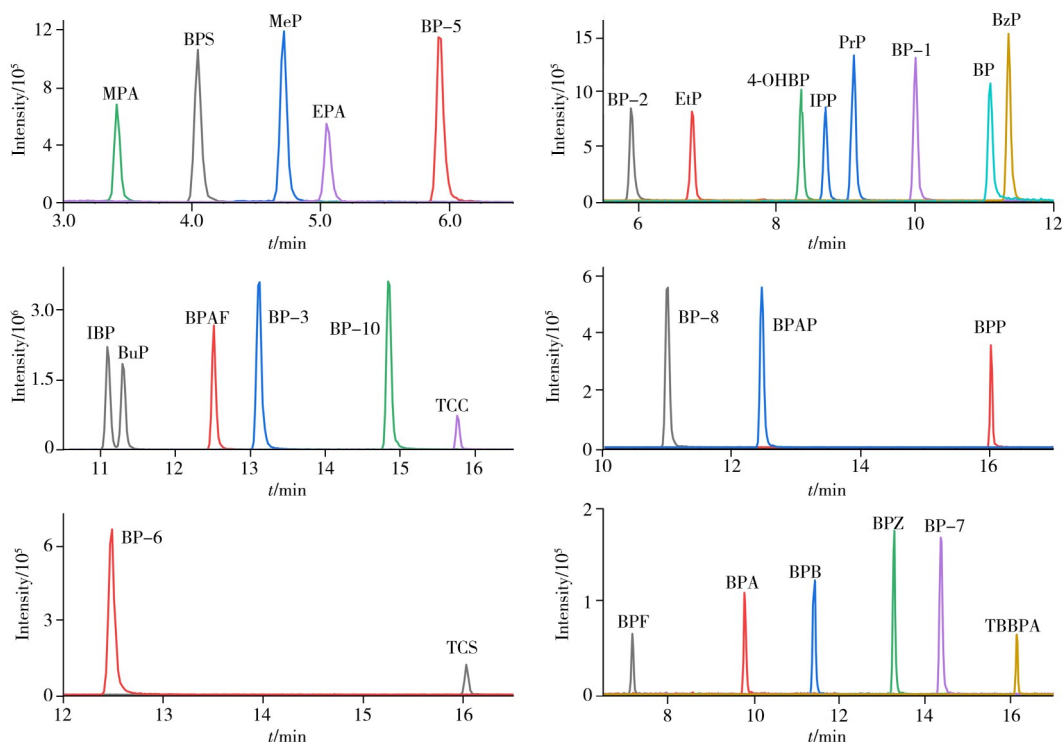


图1 30种EDCs的定量离子色谱图

Fig. 1 Quantitative ion chromatograms of 30 EDCs

2.3 样品前处理优化

SLE是非常高效和经济新型萃取方法,填料的选择、洗脱剂的种类和用量、样品的酸碱性对萃取效率至关重要。本方法选用具有高比表面积、化学惰性强多孔硅藻土为液液分配载体。在选择SLE的洗脱溶剂时,需兼顾两个关键因素:一是溶剂与水的互溶性,二是溶剂对目标化合物的溶解能力。考察了乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、环己烷4种溶剂对目标化合物的洗脱效率,各溶剂的用量均选择推荐用量(5 mL),通过计算目标化合物的回收率来评价洗脱效果。对于加标浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 的尿样,乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷、环己烷作为洗脱剂时30种EDCs的回收率分别为75.2%~112%、34.3%~104%、27.4%~108%和22.7%~107%(见图2),乙酸乙酯对各目标化合物的提取效率最佳,随着溶剂极性的减弱,溶剂的洗脱效率呈下降趋势,其中非极性的环己烷对各目标物的洗脱效率最低。BP-5、MPA和EPA受洗脱溶剂的影响大,原因在于MPA和EPA含酯基和2个酚羟基,属弱极性物质,非极性的环己烷对其的洗脱效率低,而BP-5含磺酸基和酚羟基,极性较强,仅在乙酸乙酯洗脱下的结果较理想。因此,选择乙酸乙酯作为洗脱溶剂。进一步考察了3、5、8 mL 3种洗脱体积的效果差异。结果显示,3 mL乙酸乙酯无法实现完全洗脱,部分目标物的回收率不足60%;而5 mL和8 mL洗脱体积均能获得理想的回收效果,30种EDCs的回收率均超过70%,且二者洗脱效率相当。为节约试剂,最终确定5 mL为最佳洗脱体积。此外,实验发现,在洗脱溶剂体积一定的情况下,分2次加入的洗脱效果明显优于1次的结果。

在SLE中,样品的pH值也是影响目标化合物萃取效率的关键因素,在尿样中加入适量的缓冲溶液再上样,可以维持目标分析物处于分子态。考察了pH 4.0、5.0、6.5和9.0的乙酸铵缓冲溶液对30种EDCs回收率的影响。如图3所示,30种EDCs在pH 4.0、5.0、6.5和9.0条件下的回收率分别为32.5%~99.4%、75.2%~112%、52.0%~111%和27.0%~102%,大多数目标化合物受pH值的影响较小,但BP-5在pH 4.0和pH 9.0条件下的回收率分别仅为32.5%和27.0%,可能与其分子结构中的官能团特性及电离行为相关。BP-5含有磺酸基,在低pH值时易离子化,而含有的酚羟基在高pH值时易发生

解离, 导致回收率低。各目标化合物在pH 5.0时的回收率最优, 故采用pH 5.0的乙酸铵缓冲溶液。

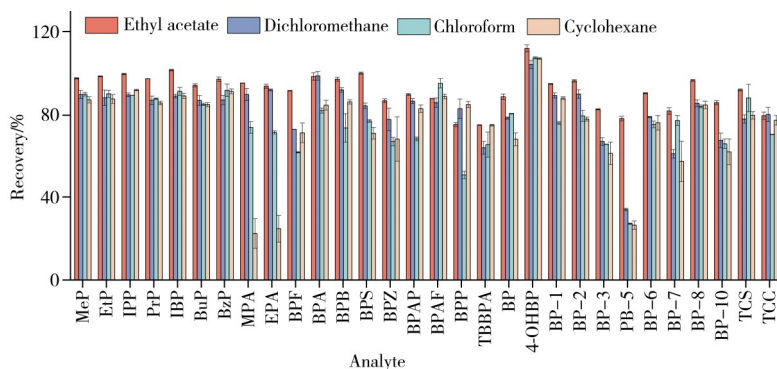


图2 不同溶剂洗脱下30种EDCs的回收率

Fig. 2 The recoveries of 30 EDCs with different elution solvents

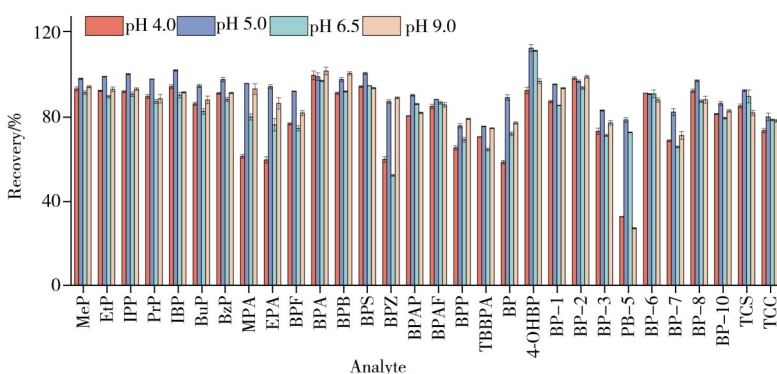


图3 不同pH值下30种EDCs的回收率

Fig. 3 The recoveries of 30 EDCs at different pH values

样品进行复溶操作时, 一般优选与初始流动相相同的溶剂, 以免出现溶剂效应。本实验中, 当采用甲醇-水(1:9)复溶样品时, 溶剂强度不够, 目标物不能充分溶解, 导致结果偏低。逐步提高复溶溶剂中甲醇的比例, 发现当甲醇比例提高至50%及以上时, 目标组分均能得到完全溶解, 定量结果相当; 但随着甲醇比例的增加, 部分目标组分的峰形变差。因此最终选择甲醇-水(1:1)作为标准配制和样品复溶的溶剂。

2.4 基质效应

按照“1.3”进行样品前处理获得空白尿液的提取液, 然后加入混合标准中间溶液, 得到质量浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准溶液, 同时以甲醇-水(1:1)配制同浓度的标准溶液。以各目标组分在基质匹配标准溶液和溶剂标准溶液下质谱响应的比值来评估基质效应。表2结果表明, 30种EDCs的基质效应为0.82~1.11, 均属于弱基质效应。

2.5 线性范围、检出限及定量下限

按照“1.4”和“1.5”条件测定混合标准工作溶液, 以各溶液中EDCs浓度和EDCs与其对应内标的峰面积比绘制标准曲线, 采用内标法进行定量。结果表明, 30种EDCs在0.10~80 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 相关系数(r)均大于0.999。在空白尿样提取液中添加标准品进行测定, 以定量离子的3倍信噪比评估方法检出限(LOD), 10倍信噪比评估定量下限(LOQ)。30种EDCs的LOD为0.003~0.094 $\mu\text{g/L}$, LOQ为0.009~0.313 $\mu\text{g/L}$ (表2)。

2.6 准确度及精密度

采用空白尿液基质, 分别添加低、中、高(1.00、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$)3个浓度的混合标准溶液, 平行测定6次, 计算回收率。在同一天内对同一尿样进行6次平行测定, 计算日内精密度; 连续6 d内测定同一尿样, 计算日间精密度。由表2可知, 30种EDCs的回收率为86.9%~127%, 日内精密度为1.0%~8.7%, 日间精密度为1.1%~8.2%。实验结果表明, 本方法具有可靠的回收率和良好的稳定性, 符合生物样本检测的技术要求。

表2 30种EDCs的LOD、LOQ、基质效应、回收率及相对标准偏差
Table 2 LODs, LOQs, matrix effect, recoveries and RSDs of 30 EDCs

Analyte	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Matrix effect	Recovery/($n=6$)			RSD/($n=6$)	
				Low	Medium	High	Intra-day	Inter-day
MeP	0.022	0.072	1.03	97.9	104	98.2	3.0	1.1
EtP	0.012	0.040	1.04	99.2	106	99.6	2.3	1.8
IPP	0.011	0.036	1.01	96.8	105	99.9	3.5	2.4
PrP	0.013	0.044	1.02	101	110	102	2.4	2.1
IBP	0.004	0.013	0.96	101	104	100	2.3	1.7
BuP	0.007	0.022	1.03	101	104	101	1.0	3.0
BzP	0.009	0.031	1.01	102	106	101	2.9	3.8
MPA	0.025	0.082	1.04	115	113	123	4.5	2.3
EPA	0.028	0.093	1.11	107	115	127	3.0	4.1
BPF	0.094	0.313	1.05	95.6	101	94.8	8.7	8.2
BPA	0.033	0.110	1.08	102	103	102	7.9	3.7
BPB	0.015	0.050	0.95	99.1	110	100	6.1	5.2
BPS	0.004	0.013	1.04	99.1	101	99.5	3.0	1.1
BPZ	0.071	0.238	1.03	99.7	108	105	4.1	5.2
BPAP	0.005	0.016	1.02	106	112	101	3.0	3.0
BPAF	0.004	0.012	0.99	101	109	104	2.3	1.4
BPP	0.008	0.028	1.07	122	112	102	6.8	4.8
TBBPA	0.058	0.192	1.01	108	114	104	5.0	5.9
BP	0.008	0.027	0.99	98.5	106	99.0	6.9	7.8
4-OHBP	0.003	0.009	1.07	100	107	101	3.9	1.9
BP-1	0.008	0.025	1.05	109	113	110	3.3	1.3
BP-2	0.018	0.060	1.07	102	101	108	5.4	2.6
BP-3	0.017	0.056	0.82	105	108	100	4.1	2.1
BP-5	0.012	0.040	1.06	101	105	98.9	6.3	4.5
BP-6	0.006	0.022	1.01	102	106	113	4.0	3.2
BP-7	0.032	0.106	1.01	108	112	108	3.8	6.1
BP-8	0.015	0.050	1.04	107	113	109	3.3	5.1
BP-10	0.008	0.027	0.95	110	119	103	2.9	4.9
TCS	0.031	0.102	1.11	96.3	99.1	88.5	7.3	6.6
TCC	0.016	0.052	0.92	104	105	86.9	4.6	5.0

2.7 实际样品检测

采用该方法测定150份人群尿样,测定结果见表3。尿液中除BPB、BPZ、BPP、BP-5、BP-6、BP-7和BP-8未检出外,其余23种EDCs的检出率为0.7%~100%,未检出化合物可能与人群暴露水平低或方法检出限有关。9种对羟基苯甲酸酯类化合物在150份样品中均有检出,超过50%的样品中检出了MeP、MPA和PrP,平均检出浓度分别为49.60、7.61、12.56 $\mu\text{g/L}$,MeP的检出率为100%,最大检测浓度为936.3 $\mu\text{g/L}$,可见对羟基苯甲酸酯类物质在生产生活中应用广泛,且MeP最常用。在双酚类物质中,BPA以94.7%的检出率居首,最高检出浓度为164.2 $\mu\text{g/L}$ 。BPS的检出率为38.7%,其余7种双酚类物质的检出率低于5.0%,可见BPA仍是该行业使用最广泛的双酚类物质。在10种二苯甲酮类目标物中,4-OHBP、BP-1、BP、BP-3、BP-2、BP-10的检出率分别为96.7%、60.7%、53.3%、35.3%、2.0%和2.0%。样本中还检测到广泛应用于护理产品中的TCS和TCC,检出率分别为42.0%和12.7%,最高检出浓度分别为239.5 $\mu\text{g/L}$ 和11.8 $\mu\text{g/L}$ 。上述结果表明EDCs在人体中普遍存在,且个别人群存在EDCs高暴露的风险,需引起重视。

表3 人尿中30种EDCs的检出浓度($n=150$)
Table 3 Detected concentration of 30 EDCs in human urine samples($n=150$)

Analyte	Detection frequency/%	Minimum/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Maximum/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Arithmetic mean/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Median value/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
MeP	100	0.22	936.3	49.60	3.19
EtP	31.3	— [*]	257.2	5.31	—
IPP	0.7	—	仅1例检出,质量浓度0.20 $\mu\text{g/L}$	—	—
PrP	54.0	—	195.4	12.56	0.22
IBP	1.3	—	0.22	—	—
BuP	5.3	—	1.36	0.02	—
BzP	3.3	—	0.49	0.01	—

(续表 3)

Analyte	Detection frequency/%	Minimum/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Maximum/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Arithmetic mean/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Median value/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
MPA	63.3	—	404.5	7.61	1.20
EPA	19.3	—	346.1	2.60	—
BPF	0.7	仅 1 例检出, 浓度 5.30 $\mu\text{g/L}$			
BPA	94.7	—	164.2	4.33	0.68
BPB	0	—	—	—	—
BPS	38.7	—	23.64	0.27	—
BPZ	0	—	—	—	—
BPAP	2.0	—	0.32	0.01	—
BPAF	4.0	—	0.61	0.02	—
BPP	0	—	—	—	—
TBBPA	0.7	仅 1 例检出, 浓度 0.34 $\mu\text{g/L}$			
BP	53.3	—	17.75	0.96	0.17
4-OHBP	96.7	—	1.69	0.89	0.87
BP-1	60.7	—	20.82	0.71	0.10
BP-2	2.0	—	1.43	0.02	—
BP-3	35.3	—	23.90	0.61	—
BP-5	0	—	—	—	—
BP-6	0	—	—	—	—
BP-7	0	—	—	—	—
BP-8	0	—	—	—	—
BP-10	2.0	—	0.77	0.011	—
TCS	42.0	—	239.5	6.17	—
TCC	12.7	—	11.8	0.19	—

*: not detected

2.8 方法比较

目前人尿中多类 EDCs 同时检测的方法有限, 通过调研文献, 对本方法与文献方法进行了比较(表 4)。本方法可同时检测 4 个类别 30 种分析物, 检测灵敏度高于大多数方法; 本方法的尿液用量仅 0.5 mL, 低于大部分方法。此外, 本方法的基质效应低, 避免了 LLE 中常见的乳化现象, 与 SPE 相比, SLE 无需活化和淋洗步骤, 操作简便快速。

表 4 本方法与文献报道的人尿中 EDCs 检测方法的比较

EDCs				<i>n</i>	Sample volume/mL	Method	Recovery/%	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ref.
Paraben	Bisphenol	Benzophenone	Antiseptic						
√	√	√	√	21	1.0	LLE	73.0~111	0.01~0.20	[20]
√	√	√	√	18	0.2	LLE	76.7~116	0.0001~0.08	[21]
/	√	/	/	6	2.0	SPE	81.4~112	0.05~0.60	[24]
√	/	√	√	12	1.0	SPE	89.5~112	0.06~1.09	[26]
√	/	√	√	15	1.0	SPE	89.1~110	0.01~1.20	[27]
√	√	/	/	15	2.0	SLE	84.3~120	0.01~0.10	[30]
√	√	√	√	30	0.5	SLE	86.9~127	0.003~0.094	This study

n: the number of studied analytes in the method; /: not mentioned; √: detected

3 结 论

本文通过优化 SLE 条件和 UPLC-MS/MS 参数, 实现了尿液中 30 种 EDCs 的同时分析。方法操作简便, 能同时检测对羟基苯甲酸酯、双酚类、二苯甲酮类化合物和抗菌剂。该方法基质干扰小, 采用溶剂标准曲线定量, 具有较高的准确度、稳定性和灵敏度, 实现了尿液中 EDCs 的高通量检测, 为大规模人群生物监测提供了高效的 EDCs 测定方案。

参考文献:

[1] Kavlock R J, Daston G P, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray L E, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac M J, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan D M, Sinks T, Tilson H A. *Environ. Health Perspect.*, **1996**, 104(4): 715-740.

[2] Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J P, Giudice L C, Hauser R, Prins G S, Soto A M, Zoeller R T, Gore A C. *Endocr. Rev.*, **2009**, 30(4): 293-342.

- [3] Chen D, Kannan K, Tan H L, Zheng Z G, Feng Y L, Wu Y, Widelka M. *Environ. Sci. Technol.*, **2016**, 50(11): 5438–5453.
- [4] Chen M H, Yu B, Zhang Z F, Ma W L. *Environ. Pollut.*, **2021**, 282: 117058.
- [5] Ramalho A, Vale A, Carvalho F, Fernandes E, Freitas M. *Toxicology*, **2025**, 515: 154125.
- [6] Liao C Y, Kannan K. *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, 48(7): 4103–4109.
- [7] Bai X Y, Zhang B, He Y, Hong D H, Song S M, Huang Y Y, Zhang T. *Environ. Pollut.*, **2020**, 266: 115117.
- [8] Wei X P, Hu Y, Zhu Q Q, Gao J, Liao C Y, Jiang G B. *Environ. Res.*, **2022**, 204: 112366.
- [9] Lauretta R, Sansone A, Sansone M, Romanelli F, Appetecchia M. *Front. Endocrinol.*, **2019**, 10: 178.
- [10] Gao C Z, He H H, Qiu W H, Zheng Y, Chen Y Y, Hu S Y, Zhao X. *Environ. Sci. Technol.*, **2021**, 55(3): 1953–1963.
- [11] Gingrich J, Ticiani E, Veiga-Lopez A. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2020**, 31(7): 508–524.
- [12] Wei X P, Zhang N, Zhu Q Q, Hu Y, Wang X, Weng X Y, Liao C Y, Jiang G B. *Environ. Health*, **2024**, 2(12): 902–911.
- [13] Sohoni P, Tyler C R, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter J P. *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35(14): 2917–2925.
- [14] Yue M J, Zhou X L, Fan J T, Gao S, Zhao X E, Zhu S Y, Liu Q, Jiang G B. *Trends Anal. Chem.*, **2024**, 171: 117523.
- [15] Azzouz A, Rascón A J, Ballesteros E. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2016**, 119: 16–26.
- [16] González N, Cunha S C, Monteiro C, Fernandes J O, Marquès M, Domingo J L, Nadal M. *Environ. Res.*, **2019**, 176: 108576.
- [17] Wang Y, Li G L, Zhu Q Q, Liao C Y. *Talanta*, **2019**, 205: 120144.
- [18] Jimenez-Diaz I, Artacho-Cordon F, Vela-Soria F, Belhassen H, Arrebola J P, Fernandez M F, Ghali R, Hedhili A, Olea N. *Sci. Total Environ.*, **2016**, 562: 81–88.
- [19] Rocha B A, de Oliveira A R M, Barbosa F Jr. *Talanta*, **2018**, 183: 94–101.
- [20] Bocato M Z, Cesila C A, Lатарo B F, de Oliveira A R M, Campiglia A D, Barbosa F Jr. *Environ. Res.*, **2020**, 189: 109883.
- [21] Ao J J, Zhang Q L, Tang W F, Yuan T, Zhang J. *Chemosphere*, **2021**, 278: 130494.
- [22] Silveira R S, Rocha B A, Rodrigues J L, Barbosa F Jr. *Chemosphere*, **2020**, 240: 124951.
- [23] Zhou X L, Kramer J P, Calafat A M, Ye X Y. *J. Chromatogr. B*, **2014**, 944: 152–156.
- [24] Zhang Z N, Zhu Y, Lin S B, Hu X J, Yang Y W. *J. Instrum. Anal.* (张卓娜, 朱英, 林少彬, 胡小键, 杨艳伟. 分析测试学报), **2020**, 39(3): 371–376.
- [25] Qin W Z, Huang C P, Wang F, Ren Y, Lu S Y, Luo L. *J. Instrum. Anal.* (秦威振, 黄承鹏, 王甫, 任燕, 陆少游, 罗兰. 分析测试学报), **2025**, 44(4): 726–731.
- [26] Han L X, Zhang X, Hu X J, Zhang H J, Qiu T, Lin X, Zhu Y. *Chin. J. Chromatogr.* (韩林学, 张续, 胡小键, 张海婧, 邱天, 林潇, 朱英. 色谱), **2023**, 41(4): 312–322.
- [27] Lin X, Han L X, Zhang H J, Zhang X, Qiu T, Hu X J, Zhu Y. *Environ. Chem.* (林潇, 韩林学, 张海婧, 张续, 邱天, 胡小键, 朱英. 环境化学), **2024**, 43(10): 3306–3316.
- [28] Zhang Y, Cao H C, Jiang H L. *Bioanalysis*, **2013**, 5(3): 285–288.
- [29] Han Y Z, Sheng W L, Wang X M, Ren C X, Zhang C Y, Zheng S Z. *J. Instrum. Anal.* (韩伟陟, 盛万里, 王晓敏, 任彩霞, 张春艳, 郑书展. 分析测试学报), **2025**, 44(3): 506–513.
- [30] Xue Y F, Shang T, Cui J T, Zhao L J, Li P, Zeng X Y, Yu Z Q. *Chin. J. Chromatogr.* (薛钰凡, 商婷, 崔君涛, 赵灵娟, 李佩, 曾祥英, 于志强. 色谱), **2024**, 42(9): 827–836.
- [31] Ma W P, Gao X, Guo H, Chen W M. *J. Chromatogr. B*, **2021**, 1171: 122608.

(责任编辑: 丁 岩)