

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2024032103

CSTR:32061.14.hjhx.2024032103

钟秀华, 邓靖, 朱盼, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱同时测定人尿中 15 种个人护理品[J]. 环境化学, 2024, 43(12): 4093-4103.
ZHONG Xiuhua, DENG Jing, ZHU Pan, et al. Simultaneous determination of 15 personal care products in human urine samples by using solid-phase extraction ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43(12): 4093-4103.

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱同时测定 人尿中 15 种个人护理品*

钟秀华¹ 邓靖¹ 朱盼¹ 鲁琳¹ 苏广宁¹ 曲亚斌¹
连晓文¹ 龙朝阳¹ 郭凌川^{2**} 余胜兵^{1**}

(1. 广东省疾病预防控制中心, 广东, 511430; 2. 中国环境科学研究院, 北京, 100012)

摘要 建立同时测定人尿液中 15 种防腐剂、防晒剂和抗菌剂的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱测定方法(SPE-UPLC-MS/MS). 采用 1 mL 尿液经 β -葡萄糖醛酸酶过夜酶解后, 以 Oasis HLB(3 cc/60 mg) 固相萃取柱进行富集后, 采用 Acquity BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱进行分离, 负离子电喷雾多反应监测模式检测, 内标法定量. 结果表明, 15 种分析物在相应线性范围内的相关系数(r)均大于 0.9949, 检出限为 0.005—0.24 ng·mL⁻¹, 方法定量限为 0.017—0.8 ng·mL⁻¹. 在定量限、1.0 ng·mL⁻¹ 和 5.0 ng·mL⁻¹ 的 3 个加标浓度下, 回收率为 80.0%—121%, 日内和日间精密度分别为 1.3%—7.7% ($n=6$) 和 3.7%—14% ($n=6$), 将本方法应用于 95 名志愿者随机尿液的测定, 结果显示 4-羟基苯甲酸甲酯(MeP)、4-羟基苯甲酸乙酯(EtP)、4-羟基苯甲酸丙酯(PrP)、三氯生(TCS)和三氯卡班(TCC), 检出率分别为 100%、100%、100%、92.5% 和 87.1%, 其中位浓度为分别为 4.11、0.69、0.52、5.12、1.95 ng·mL⁻¹. 本方法具有准确、可靠、稳定、易操作和便于在实验室推广等优点, 可用于实际样品的检测.

关键词 个人护理品, 固相萃取, 超高效液相色谱-串联质谱, 尿.

中图分类号 X-1; O6 文献标识码 A

Simultaneous determination of 15 personal care products in human urine samples by using solid-phase extraction ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

ZHONG Xiuhua¹ DENG Jing¹ ZHU Pan¹ LU Lin¹ SU Guangning¹ QU Yabin¹
LIAN Xiaowen¹ LONG Chaoyang¹ GUO Lingchuan^{2**} YU Shengbing^{1**}

(1. Guangdong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou, 511430, China; 2. Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing, 100012, China)

Abstract A method for simultaneous determination of 15 personal care products in human urine by solid-phase extraction ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-MS/MS) was established. The conditions for concentration of personal care products were optimized by investigating the extraction column, wash condition and elution condition. A volume of 1 mL urine was digested overnight by β -glucuronidase. The digested urine was loaded to Waters

2024年3月21日收稿(Received: March 21, 2024).

* 广东省医学科学技术研究基金(B2023028, B2023036, A2024235)和广州市科技计划(201707010476)资助.

Supported by Guangdong Medical Science and Technology Research Fund (B2023028, B2023036, A2024235) and Science and Technology Plan of Guangzhou (201707010476).

** 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: glcbzbs@126.com (郭凌川); shengbingyu@sina.com(余胜兵)

HLB (3cc/60 mg) solid phase extraction column. The sample was then washed by 1 mL of 25% (*V/W*) acetonitrile solution and eluted by 1.0 mL methanol twice. The elution solvent was blown to near dryness by nitrogen, and redissolved with 20% (*V/W*) acetonitrile solution with a final volume of 1 mL. The purified sample was subjected to UPLC-MS/MS for analysis. Waters Acquity BEH C18 column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used for separation. The internal standard was used for quantification. The linear correlation coefficients of the 15 analytes were greater than 0.995, the limits of determination and the limits of quantification were within 0.005—0.24 ng·mL⁻¹ and 0.017—0.8 ng·mL⁻¹, respectively. The recoveries of the spiked samples were 80.0%—121%. The inter-day and intra-day relative standard deviations (RSDs) were 1.3%—7.7% and 3.7%—14% respectively. This method was applied to 95 urine samples collected from volunteers. The results revealed that methyl paraben (MeP), ethyl paraben (EtP), triclosan (TCS), and Triclocarban (TCC) had the highest detection rates (96%, 56%, 100%, and 100%, respectively). The mean detection concentrations were 4.11, 0.69, 0.52, 5.12 and 1.95 ng·mL⁻¹, respectively. The result was consistent with the reported literatures. The method established in this article has been verified by inter-laboratory and actual sample testing, and it is accurate, reliable, stable, easy to operate, and easy to promote in different laboratories.

Keywords personal care products, solid-phase extraction, ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, urine.

肥皂、洗发剂、牙膏、香水与护肤品等是人们广泛使用的生活护理品,其添加剂一般为防腐剂、抗紫外线剂、抗菌剂、以及各种香料,统称为个人护理品(PCPs)^[1].人们在生产、生活中大量和频繁的使用PCPs,PCPs可随产品应用进入到环境介质,目前包括地表水、地下水、污水处理厂的进出水、土壤、大气在内的多种环境介质,以及植物组织、水生动物脂肪组织中均存在该类物质的残留^[2],相当数量的PCPs通过呼吸、皮肤接触,甚至被污染的膳食等途径直接迁移至人体内^[3].越来越多的证据表明,羟苯酯类化合物^[4]可以干扰激素信号通路,具有潜在的致畸和诱变作用^[5],并且还可能与多种生殖、免疫和呼吸系统疾病相关,如哮喘和乳腺癌^[6-8]等,对人类的健康构成威胁.二苯酮类化合物常用作个人护理品中的防晒剂以保护人体皮肤和头发免受紫外线照射,还被用作塑料表面涂层中的紫外线稳定剂^[9].动物实验表明二苯酮类化合物具有多激素效应,其中2,4-二羟基二苯甲酮(BP-1)和2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮(BP-3)具有较强的雌激素和抗雄激素效应^[10],BP-3还具有致突变效应可使小鼠卵巢细胞姐妹染色体交换和染色体畸变^[11].流行病学研究显示,慢性的三氯生(TCS)^[12]和(三氯卡班)TCC^[13]暴露可能导致生育率下降、身体发育减缓以及内源性荷尔蒙活动的改变.鉴于PCPs广泛迁移到人体并存在多种毒性效应,如何快速有效测定PCPs内暴露含量是科学评估其暴露风险的关键.由于尿液可无创采集且易于获得,近来许多研究已用尿液中PCPs含量来综合评价人体PCPs的暴露风险.

目前国内外对尿液中PCPs的分析检测主要应用气相色谱质谱(GC-MS)和液相色谱质谱(LC-MS)两种手段.对于基质复杂的样品,超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)能提供更高的精密度^[14],是目前尿液中PCPs测定最常用的分析手段.为减少尿液中其余杂质的干扰^[15],往往需要采用固相萃取、液液萃取等前处理净化浓缩^[16-17].相比于传统的液液萃取技术,固相萃取(SPE)技术可同时实现目标物的富集和净化,并且易于自动化,极大的提高了样品的测定效率.谭建华等^[18]采用固相萃取-超高效液相色谱质谱联用法测定人体尿液中4-羟基苯甲酸酯类等6种PCPs,韩林学等采用UPLC-MS/MS测定人尿中12种典型个人护理品^[2].由于4-羟基苯甲酸异丙酯(IPP)、4-羟基苯甲酸异丁酯(IBP)和4-羟基苯甲酸戊酯(AmP)被广泛使用^[19],其在人体内的暴露量研究还较少.

本文研究了15种典型PCPs(8种羟苯酯类防腐剂、5种二苯酮类紫外吸收剂和2种抗菌剂)来评估其在人体内的暴露风险.通过对固相萃取、色谱质谱条件的优化,建立了一次进样同时测定15种PCPs方法.该方法具有操作简便、定量准确、重复性好且所需样本量少、有机溶剂消耗少、对检测人员和环境更友好、可推广等优点,可应用于实际人群尿液样品的检测.为避免不同尿液的基质效应的

影响, 本方法采用了内标法对目标 PCPs 进行定量, 避免假阳性, 提高样品检测效率。

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱联用仪(BSM-TQS, 美国 Waters 公司). 离心机(3K15, 美国 Sigma 公司). 氮吹浓缩仪(美国 Organomation 公司). 恒温水浴摇床(上海精骐). 涡旋振荡器(IKA). Oasis HLB C18 (3 cc/60 mg). 4-羟基苯甲酸甲酯(Methyl Paraben, MeP)、4-羟基苯甲酸乙酯(Ethyl Paraben, EtP)、4-羟基苯甲酸正丙酯(Propyl Paraben, PrP)、4-羟基苯甲酸异丙酯(Isopropyl Paraben, IPP)、4-羟基苯甲酸正丁酯(Butyl Paraben, BuP)、4-羟基苯甲酸异丁酯(Isobutyl Paraben, IBP)、4-羟基苯甲酸苄酯(Benzyl Paraben, BzP)、4-羟基苯甲酸戊酯(Amyl Paraben, AmP)、2,4-二羟基二苯甲酮(2,4-Dihydroxybenzophenone, BP-1)、2,2',4,4'-四羟基二苯甲酮(2,2'-4,4'-Tetrahydroxybenzophenone, BP-2)、2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮(Oxybenzone/2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone, BP-3)、2,2'-二羟基-4-甲氧基二苯甲酮(2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzophenone/Dioxybenzone, BP-8)、4-羟基苯基酮(4-Hydroxybenzophenone, 4-OHBP)、三氯生(Triclosan, TCS)和三氯卡班(Triclocarban, TCC)购自 FirstStandard 公司. 14 种稳定同位素内标购自 FirstStandard 公司, 其中 BP-3 对应稳定同位素为 BzP-¹³C₆. 乙腈、甲醇等有机试剂均为 HPLC 级(Burdick Jackson, 美国). 乙酸和乙酸铵均为 MS 级(美国 Thermo Fisher 公司); β -葡萄糖醛酸酶(>100000 units·mL⁻¹, 安普); NIST SRM 3672(美国国家标准与技术研究院).

1.2 仪器条件

色谱条件: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱, 柱温 40 °C, 进样量 10 μ L, 流速 300 μ L·min⁻¹, 流动相 A 乙腈溶液; 流动相 B 水. 梯度为: 0 min, 20% A; 2 min, 20% A; 14 min, 75% A; 15 min, 20% A; 质谱检测采用电喷雾离子源; 负离子多反应监测(MRM)扫描; 毛细管电压: 2.50 kV; 离子源温度: 150 °C; 去溶剂温度(DT): 500 °C; 去溶剂流速(DF): 1000 L·h⁻¹; 锥孔流速(CF): 150 L·h⁻¹; 雾化器压力: 7.0 Bar, 碰撞气流速(CGF): 0.25 mL·min⁻¹; 扫描时间: 100 ms; 保留时间、离子对、碰撞电压和去簇电压见表 1.

表 1 15 种 PCPs 化合物和 14 种同位素内标物的保留时间、离子对及质谱参数

Table 1 The retention time, ion pairs and mass spectrum parameters of 15 PCPs compounds and 14 isotopic internal standard

化合物种类 Type of compound	化合物名称 The name of the compound	化合物简写 Abbreviation	保留时间/min t_R	离子对(m/z) Ion pair	锥电压/V Cone voltage	碰撞能量/eV Collision energy
防腐剂	4-羟基苯甲酸甲酯	MeP	3.63	151.2>91.86* 151.2>135.87	20 20	20 12
	4-羟基苯甲酸甲酯内标	MeP- ¹³ C ₆	3.64	157.0>98.24* 157.0>141.96	1 1	20 15
	4-羟基苯甲酸乙酯	EtP	5.48	165.14>92.13* 165.14>137.15	20 20	20 15
	4-羟基苯甲酸乙酯内标	EtP- ¹³ C ₆	5.47	171>98.18* 171>143.31	12 12	20 15
	4-羟基苯甲酸正丙酯	PrP	7.15	179.1>92.10* 179.1>136.0	25 25	20 15
	4-羟基苯甲酸正丙酯内标	PrP- ¹³ C ₆	7.15	179.1>92.9* 179.1>136.9	20 20	20 15
	4-羟基苯甲酸异丙酯	IPP	6.92	185.0>98.0* 185.0>143.0	1 1	22 15
	4-羟基苯甲酸异丙酯内标	IPP-D ₇	6.85	186.0>92.0* 186.0>138	30 30	20 16

续表 1

化合物种类 Type of compound	化合物名称 The name of the compound	化合物简写 Abbreviation	保留时间/min t_R	离子对(m/z) Ion pair	锥电压/V Cone voltage	碰撞能量/eV Collision energy
防腐剂	4-羟基苯甲酸正丁酯	BuP	8.59	193.1>92.0*	20	22
				193.1>136.0	20	15
	4-羟基苯甲酸正丁酯内标	BuP- ¹³ C ₆	8.58	199.0>98.0*	18	25
				199.0>142.0	18	15
	4-羟基苯甲酸异丁酯	IBP	8.46	193.17>91.86*	20	25
				193.17>136.0	20	16
	4-羟基苯甲酸异丁酯内标	IBP-D ₉	8.38	202.0>92.0*	16	23
				202.0>136.0	16	19
	4-羟基苯甲酸苄酯	BzP	8.73	227.0>91.98*	1	20
				227.0>136.1	1	15
	4-羟基苯甲酸苄酯内标	BzP- ¹³ C ₆	8.74	233.2>98.0*	2	20
				233.2>142.0	2	15
	4-羟基苯甲酸戊酯	AmP	9.86	207.2>92.12*	25	25
				207.2>137.07	25	16
4-羟基苯甲酸戊酯内标	AmP-D ₄	9.83	211.0>96.0*	17	28	
			211.0>141.0	17	15	
防晒剂	2,4-二羟基二苯甲酮	BP-1	7.98	213.20>91.30	20	25
				213.20>135.14*	20	20
	2,4-二羟基二苯甲酮内标	BP-1-D ₅	7.93	218.00>91.00*	35	28
				218.00>135.00	35	19
	2,2',4,4'-四羟基二苯甲酮	BP-2	5.01	245.00>91.19	20	25
				245.00>135.20*	20	15
	2,2',4,4'-四羟基二苯甲酮内标	BP-2-D ₄	4.96	249.00>93.00*	15	28
				249.00>137.00	15	15
	2-羟基-4-甲氧基苯甲酮	BP-3	8.74	227.00>92.00	10	20
				227.00>136.00*	10	15
	4-羟基苯甲酸苄酯内标	BzP- ¹³ C ₆	8.74	233.2>98.0*	2	20
				233.2>142.0	2	15
	2,2'-二羟基-4-甲氧基苯甲酮	BP-8	8.99	244.22>93.04	10	20
				244.22>123.91*	10	15
2,2'-二羟基-4-甲氧基苯甲酮内标	BP-8-D ₃	8.95	246.10>93.00*	18	21	
			246.10>126.00	18	20	
4-羟基苯苯基酮	4-OHBP	6.79	196.98>92.00	10	30	
			196.98>120.00*	10	25	
4-羟基苯苯基酮内标	4-OHBP-D ₃	6.75	201.00>96.00*	12	31	
抗菌剂	三氯生	TCS	13.34	287.00>35.00*	20	5
				289.00>37.00	20	5
	三氯生内标	TCS- ¹³ C ₆	12.33	293.00>35.00*	20	5
	三氯卡班	TCC	12.13	315.00>159.74	10	30
				315.00>162.00*	10	30
	三氯卡班内标	TCC- ¹³ C ₆	12.13	319.00>132.00*	15	26
				319.00>160.00	15	15

*定量离子对. Quantitation ion.

1.3 标准溶液的配制

根据每个化合物的响应值分别准确移取适量的 15 种标准品至 10 mL 容量瓶, 用甲醇定容, 配成混合标准储备液 A. 取混合标准储备液 100 μL , 用甲醇定容至 10 mL, 配成混合标准工作溶液 B(此时溶液质量浓度为 MeP、EtP、BP-3、4-OHBP 为 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, PrP、IPP、BuP、IBP、AmP 为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, BzP、BP-1、BP-2 为 2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, BP-8 为 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, TCS 为 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, TCC 为 20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). 以上标准溶液于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用.

准确移取 TCS- $^{13}\text{C}_6$ 500 μL , 其余 13 种标准品内标各 50 μL , 用甲醇定容至 10 mL, 此时同位素内标溶液质量浓度为 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (其中 TCS- $^{13}\text{C}_6$ 的质量浓度为 5000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用.

1.4 样品前处理

从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱取出尿样, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中解冻过夜后放置至室温. 涡旋混匀后, 移取 1 mL 尿样至 15 mL 聚丙烯离心管中, 加入 500 μL 乙酸铵-酶缓冲溶液(500 $\text{units}\cdot\text{mL}^{-1}$)和 15 μL 混合内标工作液(7.5 ng). 涡旋混匀后, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床下水浴酶解过夜. 样品从恒温摇床取出, 放置至室温后离心(4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)10 min, 用移液器吸取上清液至萃取柱进行固相萃取.

依次采用 3.0 mL 甲醇和 2.0 mL 水活化平衡 Oasis HLB 固相萃取柱, 之后分两次移取样品上清液至固相萃取柱, 在不加压力的条件下依靠自然重力过柱, 1.0 mL 25% 乙腈水溶液快速淋洗, 空气抽干 3 min. 最后用 2.0 mL 甲醇溶液分 2 次缓慢洗脱 2 min. 萃取完成后, 置于氮吹仪中氮气吹至近干, 用 20%(*V:V*)乙腈水溶液复溶至 0.5 mL, 经水性滤膜过滤后上机测定.

1.5 质量控制

实际样本检测过程中按标准曲线, 2 个过程空白样品, 2 个 NIST SRM 3672 质控样, 实际样品顺序进行分析, 每 10 针进 1 针标准样, 并按实际样本量的 10% 的比例设置现场平行样品. 过程空白的测定值应低于方法检出限(LOD), NIST 质控样中各分析物的测定值与证书参考值的比值应在 0.8—1.2 之间. 现场平行样($n=2$)结果采用相对偏差(RD)进行评估, RD 应低于 5%, 现场平行样($n>2$)结果采用相对标准偏差(RSD)评估, RSD 应低于 10%.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 色谱条件的优化

考察了 3 种色谱柱 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (100 $\text{mm}\times 2.1\text{mm}$, 1.7 μm)、Waters Cortecs C_{18}^+ (2.1 $\text{mm}\times 100\text{ mm}$, 1.6 μm)和 Waters Acquity UPLC HSS T_3 (100 $\text{mm}\times 2.1\text{ mm}$, 1.8 μm)对 15 种 PCPs 及其内标的分离效果. 结果发现在标准溶液和实际样品中, 目标物经各色谱柱分离的灵敏度和信噪比均表现为 BEH C_{18} 柱显著优于 Cortecs C_{18}^+ 柱和 HSS T_3 柱, 且 BuP 和 IBP 同分异构体在 BEH C_{18} 分离效果更好. 考虑到 BEH C_{18} 为实验室常规色谱柱, 因此选择 BEH C_{18} 柱作为本方法的分离柱. 最优流动相条件下 15 种分析物的色谱图见图 1.

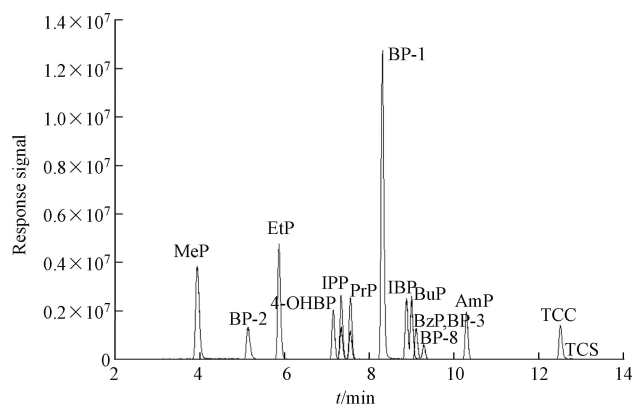


图 1 最优流动相条件下 15 种目标物的色谱图

Fig.1 The chromatograms of 15 target compounds under the optimal mobile phase conditions

2.2 萃取条件的优化

2.2.1 固相萃取柱的选择

比较了 Waters Oasis HLB(60 mg)、CNW HLB(60 mg)、CNW LC-C₁₈(200 mg)和 Supelco ENVI-18(500 mg)对 15 种 PCPs 的萃取效果,结果发现 PrP 在 CNW LC-C₁₈ 柱子中的回收率超 160%,TCC 在 CNW HLB 柱子中的回收率超 150%。表明 PrP 和 TCC 这两种物质在 CNW LC-C₁₈ 和 CNW HLB 柱子上本底较高,而 Waters Oasis HLB 和 Supelco ENVI-18 对 15 种个人护理用品的萃取效率接近,基本可以稳定保持在 80%—120%,如图 2 所示,说明 Waters Oasis HLB 和 Supelco ENVI-18 都可以很好的保留分析物,考虑到 Supelco ENVI-18 是 500 mg 的固定相,过柱速度太慢影响实验效率,因而本实验选择 Waters Oasis HLB 对目标物进行萃取。

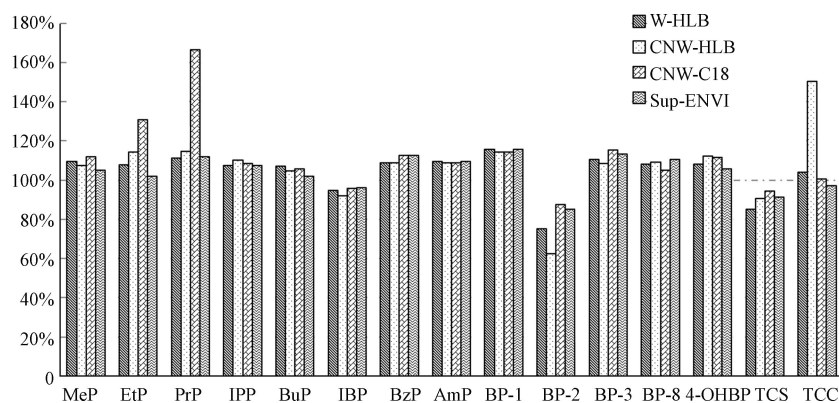


图 2 不同固相萃取柱对 15 种目标物的萃取效率图

Fig.2 The extraction efficiency of 15 target compounds with different spe columns

2.2.2 洗脱条件优化

比较了常用洗脱溶剂甲醇、甲醇-乙腈($V:V=1:2$)、甲醇-乙腈($V:V=1:1$)、甲醇-乙腈($V:V=2:1$)和乙腈的洗脱效果。结果如图 3 所示,发现 2.0 mL 甲醇和甲醇-乙腈($V:V=1:1$)对 15 种目标物的绝对回收率相差不大,而乙腈对 BP-2 和 TCS 的这两种化合物的洗脱效率较低,EtP 在甲醇-乙腈($V:V=1:2$)和甲醇-乙腈($V:V=2:1$)的洗脱条件下回收率分别达到 184% 和 197%,降低洗脱溶剂的极性可能会导致目标物和尿液中弱极性干扰物共同流出,导致回收率偏高。因此,选择甲醇为洗脱溶剂。同时,考察了洗脱次数的影响,发现 2.0 mL 甲醇分两次洗脱基本可以确保 15 种目标物的回收率均在 95% 以上,达到较好的洗脱效果。

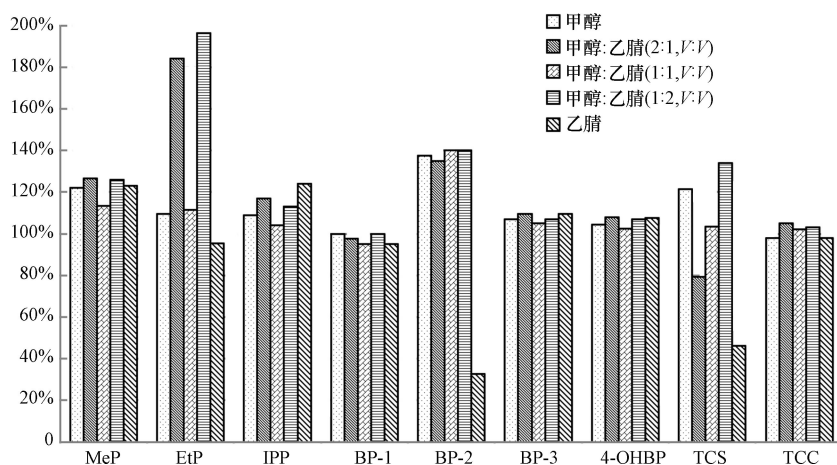


图 3 不同比例洗脱溶剂对部分目标物的洗脱效率图

Fig.3 The elution efficiency diagram of different proportion of elution solvent on some target substances

2.2.3 淋洗条件的优化

比较不同体积分数的甲醇水溶液(10%、20%、25% 和 30%)和乙腈水溶液(10%、20%、25% 和

30%)对分析物淋洗效果的影响. 发现以乙腈水溶液作为淋洗液时, MeP 具有更高的质谱响应信号, 为提高分析物的灵敏度, 本实验选择乙腈水溶液作为淋洗液. 同时, 考察了有机相比例的影响, 发现有机相比例为 25% 时分析物的定量离子峰面积达到最优状态. 淋洗液中有机相比例的增加可以降低淋洗液的极性, 从而有效去除尿液基质中的干扰物, 降低基质效应.

2.3 基质效应评价

选用 5 个不同来源的尿样, 按“1.4 节”进行前处理并收集洗脱液. 将 5 份尿样洗脱液和甲醇溶液分别配制成 0.05、0.10、0.15、0.25、0.50、1.0、2.5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (MeP、EtP、BP-3 和 4-OHBP 为 0.10、0.20、0.30、0.50、1.0、2.0、5.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; BzP、BP-1 和 BP-2 为 0.02、0.04、0.06、0.10、0.20、0.40、1.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; BP-8 为 0.40、0.80、1.2、2.0、4.0、8.0、20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; TCS 为 1.0、2.0、3.0、5.0、10、20、50 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; TCC 为 0.20、0.40、0.60、1.0、2.0、4.0、10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 6 条标准曲线上机测定. 按照文献^[19]的方法, 通过比较尿样标准曲线与甲醇标准曲线斜率的比值评估基质效应(见图 4a). 当 $|\text{ME}| > 0$, 表现为基质增强效应, $|\text{ME}| < 0$ 时, 表现为基质抑制效应, 当 $0 \leq |\text{ME}| \leq 20\%$ 时, 说明基质对信号干扰较低, 可忽略不计, 当 $20\% < |\text{ME}| < 50\%$ 时, 表现为中等强度的基质效应, 而当 $|\text{ME}| \geq 50\%$ 时, 则为强基质干扰, 结果如图 4a 显示, 15 种 PCPs 采用稳定同位素内标法(根据待测物的浓度和待测物与内标物响应信号的比值绘制标准曲线, 消除分析过程中的一些误差和变异性)校正前多数物质均属于中等基质效应, 仅 MeP、EtP 和 BP-2 表现为强基质效应. 采用稳定同位素内标校正后, 结果如图 4b 显示, 15 种分析物的基质效应均表现为弱基质效应(88.0%—120.8%).

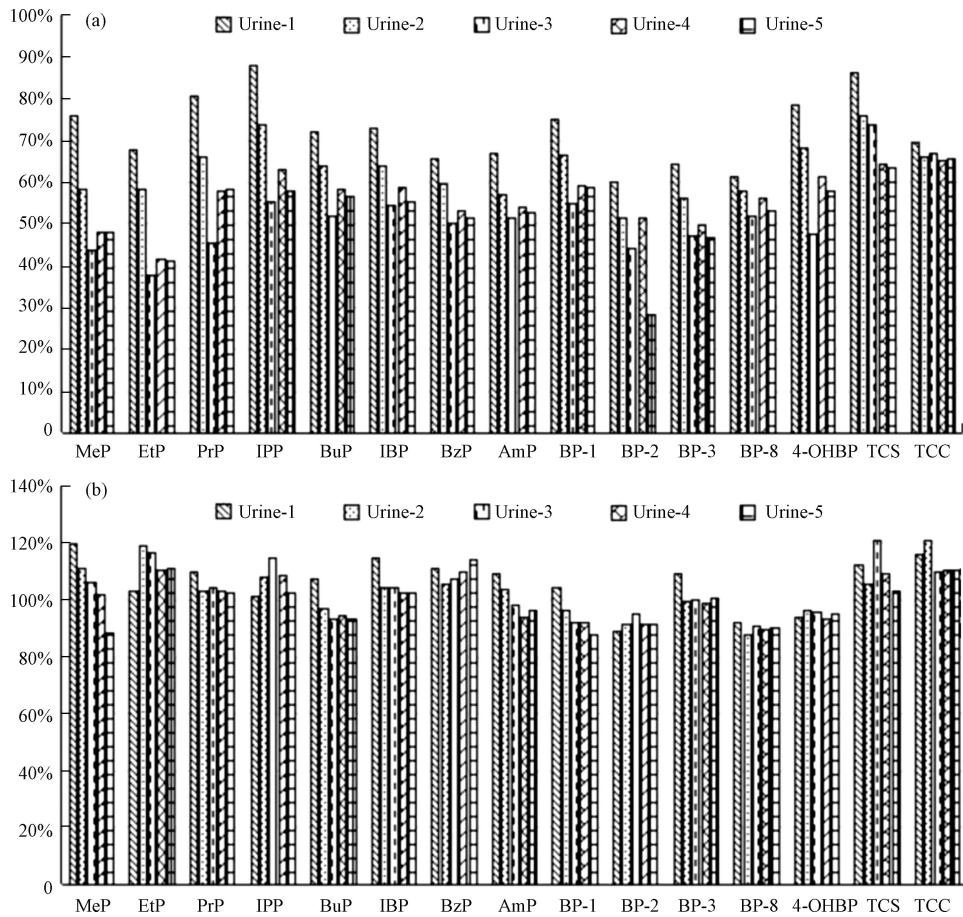


图 4 15 种 PCPs 采用稳定同位素内标法校正前(a)和校正后(b)的基质效应

Fig.4 The matrix effects of 15 PCPs before and after correction by stable isotopic internal standardization.

2.4 方法线性范围与检出限、定量限

如表 2 所示, 以分析物定量离子峰面积与内标离子峰面积之比(y)与对应质量浓度(x , $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)绘制校准曲线, MeP、EtP、BP-3、4-OHBP 在 0.10、0.20、0.30、0.50、1.0、2.0、5.0、10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、BzP、BP-1、

BP-2 在 0.02、0.04、0.06、0.10、0.20、0.40、1.0、2.0 ng·mL⁻¹、BP-8 在 0.40、0.80、1.2、2.0、4.0、8.0、10、20、40 ng·mL⁻¹、TCS 在 1.0、2.0、3.0、5.0、10、20、50、100 ng·mL⁻¹、TCC 在 0.20、0.40、0.60、1.0、2.0、4.0、10、20 ng·mL⁻¹、其余分析物在 0.05、0.10、0.15、0.25、0.50、1.0、2.5、5.0 ng·mL⁻¹ 的范围内线性关系良好, 相关系数(r)均大于 0.996. 采用低本底的尿样, 使标准的加标浓度分别为标准曲线最低点的 1/3, 按照前处理方法浓缩, 测定相应分析物的值, 平行测定 7 次, 计算 3 倍标准偏差为检出限(LOD), 10 倍标准偏差为定量限(LOQ), 见表 2.

表 2 15 种目标物的线性范围、相关系数、方法检出限和方法定量限

Table 2 Linear range, correlation coefficient, limit of detection(LOD), and limit of quantification(LOQ) for 15 kinds of target analytes

分析物 Analyte	线性范围/(ng·mL ⁻¹) Linear range	相关系数 Correlation coefficient(r)	检出限/(ng·mL ⁻¹) LOD	定量限/(ng·mL ⁻¹) LOQ
MeP	0.1—10	0.9991	0.028	0.09
EtP	0.1—10	0.9995	0.028	0.09
PrP	0.05—5.0	0.9994	0.014	0.047
IPP	0.05—5.0	0.9998	0.011	0.037
BuP	0.05—5.0	0.9979	0.015	0.050
IBP	0.05—5.0	0.9977	0.014	0.047
BzP	0.02—2.0	0.9996	0.006	0.02
AmP	0.05—5.0	0.9997	0.013	0.044
BP-1	0.02—2.0	0.9949	0.005	0.017
Bp-2	0.02—2.0	0.9975	0.006	0.02
BP-3	0.1—10	0.9981	0.020	0.067
BP-8	0.4—40	0.9961	0.10	0.34
4-OHBP	0.1—10	0.9976	0.028	0.094
TCS	1.0—100	0.9979	0.24	0.80
TCC	0.2—20	0.9997	0.06	0.20

2.5 方法的回收率和精密度

采用实际尿液考察了方法的回收率和精密度, 结果如表 3 所示, 在定量限、1.0 ng·mL⁻¹ 和 5.0 ng·mL⁻¹ 3 个加标浓度下, 所有分析物的加标回收率在 80.0%—121% 之间, 日内精密度的 1.3%—7.7% ($n=6$), 日间精密度 3.7%—14% ($n=6$). 回收率和 RSD 均在可接受范围内.

表 3 15 种目标物的加标回收率、日间精密度和日内精密度($n=6$)

Table 3 Spiked recoveries, relative standard deviations (RSD) of intra-day and inter-day for 15 kinds of target analytes

分析物 Analyte	低浓度回收率/% Low concentration recovery	中浓度回收率/% Medium concentration recovery	高浓度回收率/% High concentration recovery	日内精密度/% Intra-day RSD	日间精密度/% Inter-day RSD
MeP	110	104	110	3.4	4.5
EtP	93.3	96.3	121	2.7	3.9
PrP	82.3	82.3	106	3.3	6.1
IPP	80.0	106	111	2.5	5.1
BuP	102	104	105	3.2	6.6
IBP	84.8	91.1	90.1	2.2	3.7
BzP	103	112	113	1.3	4.9
AmP	104	109	108	1.5	3.7
BP-1	100	109	113	7.7	12
Bp-2	118	106	118	3.0	7.6
BP-3	95.5	112	116	2.5	4.2

续表 3

分析物 Analyte	低浓度回收率/% Low concentration recovery	中浓度回收率/% Medium concentration recovery	高浓度回收率/% High concentration recovery	日内精密度/% Intra-day RSD	日间精密度/% Inter-day RSD
BP-8	91.1	108	108	2.2	4.6
4-OHBP	97.5	108	111	1.6	5.9
TCS	104	108	107	7.6	14
TCC	94.3	106	111	2.7	5.8

2.6 与标准分析物对比

采用本方法对 SRM 3672 进行测定, 重复测定 6 次, NIST SRM 3672 证书上包含的 6 种 PCPs 分析物相对标准偏差均小于 9%, 与证书上参考值比对结果在可接受范围内, 说明本方法准确度满足分析要求, 可以用于实际人体尿液样品的测定。

2.7 实际样品测定

采用本方法对 93 份尿液样本进行测定, 结果如表 4 所示。其中防腐剂 MeP、EtP 和 PrP 均 100% 检出, 其中位浓度为分别为 4.11、0.69、0.52 ng·mL⁻¹, BuP 检出率为 18.3%, 防晒剂检出率较高的为 BP-3 (98.9%)、4-OHBP (98.9%) 和 BP-8 (64.5%), 其中位浓度为分别为 0.03 ng·mL⁻¹、<LOD 和 <LOD, 抗菌剂 TCS (92.5%) 和 TCC (87.1%) 检出率均较高, 其中位浓度为分别为 5.12、1.95 ng·mL⁻¹。值得关注的是, MeP 和 EtP 的个别检出浓度可达 1184 ng·mL⁻¹ 和 567.8 ng·mL⁻¹, 可见个别人群存在 MeP 和 EtP 高暴露风险, 需结合调查问卷进一步分析暴露的原因。谭建华等^[20] 在广州市儿童和孕妇尿液中检出 6 种 4-羟基苯甲酸酯类 PCPs, 检出率为 43.3%—100%, 无论儿童还是孕妇, MeP 100% 检出, 与本研究相当, 儿童和孕妇的暴露浓度中位值分别为 7.24、10.3 ng·mL⁻¹, 比本研究稍高; EtP、PrP 和 TCS 的检出率也均高于 80%, 儿童和孕妇的暴露浓度中位值分别为 0.78、1.21、1.26 ng·mL⁻¹ 和 0.51、0.44、1.10 ng·mL⁻¹, 除 TCS 中位值高于本研究外, 其余物质暴露浓度中位值与本研究相当。Engel 等^[21] 对上海市 100 位居民的尿液进行了检测, 女性尿样中甲酯和丙酯的几何平均浓度为 21.1 ng·mL⁻¹ 和 2.54 ng·mL⁻¹, 均低于本研究, 这可能来源于所选择的样本来源的差异。可见 PCPs 在人群中暴露广泛, 本研究对于开展人群 PCPs 暴露评估及环境健康危害研究提供了技术支持。

表 4 15 种 PCPs 在人尿中的测定值

Table 4 Concentrations of 15 PCPs in human urine

分析物 Analyte	检出率/% DF	几何均值/ (ng·mL ⁻¹) GM	浓度值/(ng·mL ⁻¹) Concentrations				
			第5百分位数	第25百分位数	第50百分位数	第75百分位数	第95百分位数
			P ₅	P ₂₅	P ₅₀	P ₇₅	P ₉₅
MeP	100	47.96	0.85	2.29	4.11	11.41	195.2
EtP	100	20.55	0.16	0.34	0.69	2.49	115.9
PrP	100	13.15	0.10	0.28	0.52	1.85	79.24
IPP	4.30	0.019	ND	ND	ND	ND	ND
BuP	18.28	0.036	ND	ND	ND	ND	0.12
IBP	8.60	0.022	ND	ND	ND	ND	0.06
BzP	7.53	ND	ND	ND	ND	ND	0.01
AmP	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BP-1	45.2	0.060	ND	ND	ND	ND	0.16
BP-2	44.1	0.052	ND	ND	ND	0.02	0.2
BP-3	98.9	0.052	0.03	0.03	0.03	0.04	0.15
BP-8	64.5	0.12	ND	ND	ND	0.14	0.35
4-OHBP	98.9	0.63	ND	ND	ND	0.89	1.66
TCS	92.5	26.92	ND	1.30	5.12	15.18	114.6
TCC	87.1	9.56	ND	0.81	1.95	4.78	35.98

3 结论(Conclusion)

通过对样品萃取条件和色谱质谱条件的优化,建立了固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱检测人尿中 15 种 PCPs 的方法.方法经过验证及实际样品的检验具有准确、可靠、稳定、易操作等优点,可应用于人群中典型 PCPs 类物质的内暴露检测,为开展人体生物监测奠定基础.

参考文献 (References)

- [1] 陆静,陈练,付善良,等.高效液相色谱-三重四极杆串联质谱测定环境水样中 19 种个人护理品 [J],环境化学,2019,38(8): 1930-1940.
LU J, CHEN L, FU S L, et al. Determination of 19 personal care products in environmental water samples by high performance liquid chromatography mass spectrometry [J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(8): 1930-1940(in Chinese).
- [2] 韩林学,张续,胡小键,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿中 12 种典型个人护理品 [J]. 色谱,2023,41(4): 312-322.
HAN L X, ZHANG X, HU X J, et al. Determination of 12 typical personal care products in human urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(4): 312-322 (in Chinese).
- [3] 谭建华.典型个人护理用品的来源、环境和人体暴露研究 [D].广州华南农业大学,2018.
TAN J H. Sources, environmental, and human exposure of typical personal care products [D]. Guangzhou South China Agricultural University, 2018(in Chinese).
- [4] GUO Y, KANNAN K. A survey of phthalates and parabens in personal care products from the United States and its implications for human exposure [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(24): 14442-14449.
- [5] BŁĘDZKA D, GROMADZIŃSKA J, WĄSOWICZ W. Parabens, From environmental studies to human health [J]. Environment International, 2014, 67: 27-42.
- [6] HAFEEZ F, MAIBACH H. An overview of parabens and allergic contact dermatitis [J]. Skin Therapy Letter, 2013, 18(5): 5-7.
- [7] JUNGE K M, BUCHENAUER L, STRUNZ S, et al. Effects of exposure to single and multiple parabens on asthma development in an experimental mouse model and a prospective cohort study [J]. The Science of the Total Environment, 2022, 814: 152676.
- [8] VINDENES H K, SVANES C, LYGRE S H L, et al. Exposure to environmental phenols and parabens, and relation to body mass index, eczema and respiratory outcomes in the Norwegian RHINESSA study [J]. Environmental Health: a Global Access Science Source, 2021, 20(1): 81.
- [9] CALAFAT A M, WONG L Y, YE X Y, et al. Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003: 2004 [J]. Environmental Health Perspectives, 2008, 116(7): 893-897.
- [10] SCHREURS R H M M, SONNEVELD E, JANSEN J H J, et al. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays [J]. Toxicological Sciences, 2005, 83(2): 264-272.
- [11] FRENCH J E. NTP technical report on the toxicity studies of 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (CAS No. 131-57-7) Administered Topically and in Dosed Feed to F344/N Rats and B6C3F1 Mice [J]. Toxicity Report Series, 1992, 21: 1-E14.
- [12] WEATHERLY L M, GOSSE J A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews, 2017, 20(8): 447-469.
- [13] ROCHESTER J R, BOLDEN A L, PELCH K E, et al. Potential developmental and reproductive impacts of triclocarban: A scoping review [J]. Journal of Toxicology, 2017, 2017: 9679738.
- [14] Andersen F A. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products [J]. International Journal of Toxicology, 2008, 27(Suppl 4): 1-82.
- [15] 曹淑瑞,刘治勇,张雷,等.高效液相色谱法同时测定食品中 6 种对羟基苯甲酸酯 [J]. 分析化学,2012,40: 529-533.
CAO S R, LIU Z Y, ZHANG L, et al. Simultaneous determination of six kinds of 4-hydrobenzoic acid ester in food using high performance liquid chromatography-diode array detection [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40: 529-533(in Chinese).
- [16] WANG L, WU Y H, ZHANG W, et al. Characteristic profiles of urinary p-hydroxybenzoic acid and its esters (parabens) in children and adults from the United States and China [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(4): 2069-2076.
- [17] FERRER I. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(10): 750-756.
- [18] 谭建华.典型个人护理用品的来源、环境和人体暴露研究 [J]. 工程科技 I 辑,2020,08: 63-68.
TAN J H. Sources, environmental and human exposure of typical personal care products [J]. Volume I of Engineering Science, 2020, 08: 63-68(in Chinese).

- [19] 程玲. 个人用品中对羟基苯甲酸酯的检测及其人群暴露评估研究 [J]. 医药卫生科技, 2020, 1: 21-23.
CHENG L. Detection of p-hydroxybenzoate in personal products and study on population exposure assessment[J]. Medical and Health Technology, 2020, 1: 21-23(in Chinese).
- [20] 黎娟, 乔庆东, 庄景新, 等. 改进的高效液相色谱-串联质谱方法同时测定动物性食品中 4 种 β 2-受体激动剂残留 [J]. 色谱, 2016, 34(2): 170-175.
LI J, QIAO Q D, ZHUANG J X, et al. Simultaneous determination of the residues of four β 2-agonists residue in animal foods by modified high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(2): 170-175(in Chinese).
- [21] 谭建华. 个人护理用品环境安全风险热点研究: 典型案例分析 [C// 第 38 届 (2018) 中国洗涤用品行业年会论文集, 珠海, 2018: 304-322.
TAN J H. Research on hot spots of environmental safety risks in personal care products - Typical case analysis[C]//Zhuhai. Collected Papers from the 38th (2018) Annual Conference of China's Detergent Industry, 2018: 304-322(in Chinese).
- [22] ENGEL L S, BUCKLEY J P, YANG G, et al. Predictors and variability of repeat measurements of urinary phenols and parabens in a cohort of shanghai women and men[J]. Environmental Health Perspectives, 2014, 122(7): 733-740.