

## 论著

## HPLC-FL 法检测尿液中类雌激素双酚 A 和烷基酚

肖晶<sup>1</sup> 邵兵<sup>2</sup> 吴永宁<sup>1</sup> 王竹天<sup>1</sup> 杨杰<sup>1</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021;

2. 北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

**摘要:**目的 建立尿液中类雌激素(壬基酚(NP)、辛基酚(OP)和双酚 A(BPA))的 HPLC-荧光测定方法。方法 采用 -葡萄糖苷酶、硫酸酯酶水解尿液中的结合型壬基酚、辛基酚和双酚 A,酶解后溶液采用 OASIS HLB 固相萃取柱浓缩、富集和净化。Waters XTerra™ MS C<sub>18</sub>液相色谱柱分离,甲醇+水作为流动相梯度洗脱。荧光检测,激发波长:225 nm;发射波长:310 nm。结果 NP、OP 和 BPA 具有良好的线性关系,BPA、NP 和 OP 的检出限分别为 3.7、4.9 和 7.5 ng/ml,BPA、NP 和 OP 加标回收率分别为:70.2%~95.7%、73.2%~108.2%和 76.3%~109.1%;RSD 分别为 5.61%~8.19%、6.01%~7.98%和 6.23%~8.61%。结论 该方法测定尿液中类雌激素(BPA、OP 和 NP),具有较高的灵敏度和选择性,结果准确可靠、重现性好。

**关键词:**酚类;尿;雌激素类;色谱法,高压液相

### Determination of Bisphenol A and Alkyl Phenols in Urine by High Performance Liquid Chromatography Fluorescence

XIAO Jing, SHAO Bing, WU Yong-ning, WANG Zhur-tian, YANG Jie

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021)

**Abstract: Objective** A comprehensive analytical method based on high performance liquid chromatography fluorescence detection (HPLC-FL) was established to determine BPA, NP and OP in urine. **Method** The urine samples were de-conjugated by adding -glucuronidase and sulfatase. After enzymatic treatment, the samples were subjected to the OASIS HLB column solid extraction cartridges to clear up and concentrate. The HPLC used Waters XTerra™ MS C<sub>18</sub> column, a mixture of methanol: water as mobile phase, fluorescence detector with the excitation and emission wavelength at 225 nm and 310 nm, respectively. **Results**

There was good linear relationship. The detection limits of BPA, OP and NP were 3.7 ng/ml, 4.9 ng/ml and 7.5 ng/ml, respectively. The recoveries of BPA, OP and NP were 70.2%~95.7%, 73.2%~108.2% and 76.3%~109.1%, respectively; The precisions were 5.61%~8.19%, 6.01%~7.98% and 6.23%~8.61%, respectively. **Conclusion** The results showed that the method was simple, sensitive and selective, and suitable for the determination of NP, OP and BPA in urine.

**Key word:** Phenols; Urine; Estrogens; Chromatography, High pressure Liquid

壬基酚 (nonylphenol, NP)、辛基酚 (octylphenol, OP) 和双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一类雌激素样的“内分泌化学物质”。职业人群的接触主要来源于这类物质的生产和使用,普通人群的接触主要来源于使用塑料包装材料、食用涂漆的罐装食品、使用非离子表面活性剂的洗涤剂。经生物监测,大鼠经口给予标记的壬基酚 (NP)、辛基酚 (OP) 和双酚 A (BPA) 后,主要经粪便和尿液排泄,在尿中的代谢产物主要是葡萄糖苷结合物和硫酸酯结合物,粪便中主要为 BPA、NP 和 OP 原形<sup>[1]</sup>。另有研究显示,在血

浆中的代谢产物主要为葡萄糖苷结合物并少量原形<sup>[2]</sup>。基于 BPA、NP 和 OP 的代谢方式,生物监测主要集中在检测生物样品中的水平,包括血样<sup>[3]</sup>和尿样<sup>[4]</sup>,也有报道检测精液、乳汁<sup>[5]</sup>及胎盘组织等。本文针对普通人群的尿液中 BPA、NP 和 OP 含量进行检测。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 仪器和设备

分析天平 (SARTURIUS 公司,美国)、超声波清洗器 (Elma 公司,德国)、氮吹仪 (EYELA 公司,美国)、液相色谱仪 (Waters 2695,美国)、烘箱 (Memmert 公司)、马弗炉 (CAEBOLITE 公司)、OASIS HLB 固相萃取柱 (Waters 公司,美国)。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划食品安全关键技术重大项目,化学污染物暴露评估技术研究(2006BAK02A01)。

作者简介:肖晶 女 副研究员

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

所有玻璃器皿、用具采用重铬酸钾洗液浸泡 3~8 h 再经超纯水清洗,或经过 400 °C 高温烘烤 4 h 处理,以避免在过程中引入干扰。

## 1.2 试剂和标准品

双酚 A (纯度 > 99.0%, 东京化成工业株式会社)、壬基酚 (纯度 > 99.0%, 东京化成工业株式会社)、辛基酚 (纯度 > 99.0%, Ehrenstorfer GmbH, 德国)、- 葡萄糖酸酐酶、硫酸酯酶 (Roche Diagnostics GmbH Mannheim, 德国)、甲醇 (色谱纯, Fisher 公司)、二氯甲烷 (色谱纯, Fisher 公司)、醋酸 (保证试剂, 北京化工厂)、醋酸钠 (保证试剂, 北京化工厂)、水为实验室一级用水, 电导率 (25 °C) 为 0.01 mS/min。

## 1.3 标准溶液及缓冲液的配制

双酚 A 标准储备液的制备 准确称取 10 mg 双酚 A 标准品, 溶于甲醇中并定容至 10 ml, 保存于冰箱 4 °C 中备用; 壬基酚标准储备液的制备 准确称取 10 mg 壬基酚标准品, 溶于甲醇中并定容至 10 ml, 保存于冰箱 4 °C 中备用; 辛基酚标准储备液的制备

准确称取 10 mg 辛基酚标准品, 溶于甲醇中并定容至 10 ml, 保存于冰箱 4 °C 中备用; 壬基酚、辛基酚、双酚 A 混合标准使用液 精密吸取上述壬基酚、辛基酚、双酚 A 标准储备液, 用甲醇配制使壬基酚、辛基酚、双酚 A 浓度分别为 1 ng/ml 的混合标准使用液。保存于冰箱 4 °C 中备用; 醋酸 - 醋酸钠缓冲液 (pH 5.5) 取醋酸钠 54.6 g, 加 1 mol/L 醋酸溶液 20 ml 溶解后, 加水稀释至 500 ml, 用醋酸调至 pH 5.5。

## 1.4 实验样品

采集普通人群的尿液, 共 8 个健康人 10 人次。样品在 4 °C 冰箱中保存。

## 1.5 试样前处理

1.5.1 酶解 取尿液 2.0 ml 置于 5 ml 的具塞玻璃试管中, 向其中加入 pH 5.5 的醋酸 - 醋酸钠缓冲液 100 μl, 再加入 20 μl 的 - 葡萄糖酸酐酶、硫酸酯酶, 混匀, 37 °C 水浴 3 h, 取出冷却至室温, 离心 (3000 r/min)。取上清液, 残渣用 1 ml 水洗涤, 取上清液, 合并两种上清液, 待上柱备用。

1.5.2 SPE 萃取 将上述溶液加入到处理好的 OASIS HLB 柱 (用 5 ml 水、5 ml 20% 甲醇、5 ml 二氯甲烷 + 甲醇 (90 + 10)、5 ml 水淋洗活化) 用 3 ml 水、3 ml 20% 甲醇淋洗 OASIS HLB 柱后, 用真空泵将 SPE 柱残留的液体抽去, 接下来用 5 ml 二氯甲烷 + 甲醇 (90 + 10) 洗脱。将洗脱液用氮气吹干, 然后用甲醇定容到 0.5 ml, 用于 HPLC 分析。

## 1.6 液相色谱参考条件

色谱柱 Waters XTerra™ MS C<sub>18</sub> (3.5 μm, 2.1 mm × 150 mm), 柱温: 25 °C, 荧光检测器的激发

波长: 225 nm, 发射波长: 310 nm, 流动相为甲醇 (A) 和水 (B)。

梯度洗脱程序: 55% (A) 7 min 内线性增加到 70% (A), 再于 1 min 内线性增加到 80% (A), 保持 30 min, 然后在 1 min 内线性降低到 55% (A), 保持 11 min, 等待下一针进样; 流速 0.15 ml/min。

## 2 结果

2.1 方法的线性范围 精密吸取壬基酚、辛基酚、双酚 A 混合标准使用液, 加甲醇配制 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0 ng/ml 的 BPA、NP、OP 的标准混合溶液, 各进样 10 μl, 按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积值为纵坐标, 含量为横坐标绘制校正曲线。BPA、NP 和 OP 的相关系数 *r* 分别为 0.999 8、0.998 5 和 0.998 8; 回归方程分别为  $y = 7.23 \times 10^2 x - 1.83 \times 10^5$ 、 $y = 1.06 \times 10^3 x - 1.27 \times 10^5$  和  $y = 1.71 \times 10^3 x - 2.73 \times 10^5$ 。在 0.1 ~ 1.0 ng/ml 范围内具有良好线性关系。

2.2 方法的检出限 采用峰高计算噪音水平和分析物信号, 以信噪比 3 倍的浓度作为检测限 (LOD)。结果表明尿液中 BPA、NP 和 OP 的检出限分别为 3.7、4.9 和 7.5 ng/ml。

2.3 准确度 采集尿液, 进行 BPA、NP、OP 的加标试验。各加入 1、10 和 50 ng/ml 3 个水平的标准溶液, 分析方法如实验部分中所述 ( $n = 5$ )。实验结果表明, 尿液试样 BPA、NP、OP 的加标回收率分别为 70.2% ~ 95.7%、73.2% ~ 108.2% 和 76.3% ~ 109.1%。相对标准偏差分别为 5.61% ~ 8.19%、6.01% ~ 7.98% 和 6.23% ~ 8.61%。BPA、NP 和 OP 回收率均符合欧盟指令 2001/22/EC 对加标回收率的要求 (70% ~ 110%)。

图 1~3 分别为 BPA、NP 和 OP 混合标准液、尿液试样和试样加标的液相色谱 - 荧光检测色谱图。

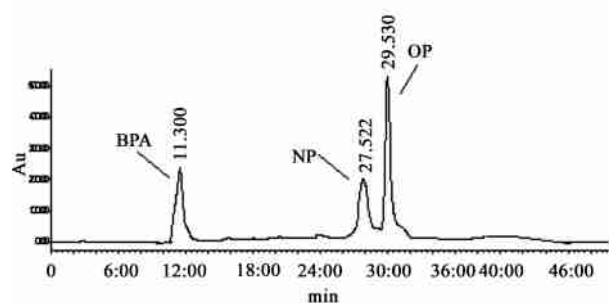


图 1 BPA、NP 和 OP 混合标准液色谱图

2.4 精密度 取试样照上述测定方法, 重复测定 5 次。BPA、NP 和 OP 的相对标准偏差分别为 7.5% ~ 14.1%、7.9% ~ 12.6% 和 3.5% ~ 15.3%, 均满足痕

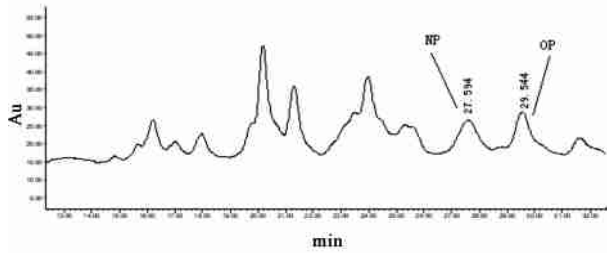


图2 尿液试样的液相色谱-荧光检测色谱图

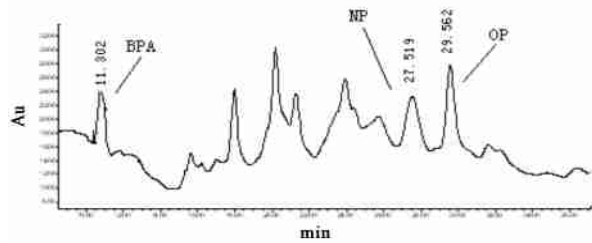


图3 尿液试样加标的液相色谱-荧光检测色谱图

量分析对精密度的要求。

2.5 试样含量测定 采集健康人群尿液,按 1.5 测定方法进行测定。精密吸取试样溶液,按 1.6 液相色谱参考条件,每个试样平行测定 2 次,取平均值,按校正曲线法计算各试样中的含量。测定结果见表 1。

表 1 尿液试样中的 BPA、NP 和 OP 含量 ng/ml

| 试样号 | BPA   | NP    | OP   |
|-----|-------|-------|------|
| 1   | 82.80 | 26.90 | 26.5 |
| 2   | ND    | 7.25  | ND   |
| 3   | ND    | 6.63  | ND   |
| 4   | ND    | 9.15  | ND   |
| 5   | 6.04  | ND    | ND   |
| 6   | ND    | ND    | ND   |
| 7   | ND    | ND    | ND   |
| 8   | ND    | ND    | ND   |

注:ND 为未检出。

### 3 讨论

#### 3.1 提取条件的优化

3.1.1 - 葡萄糖酸酐酶和硫酸酯酶的酶解作用 代谢性研究已经表明, NP、OP 和 BPA 在尿中的代谢产物主要是葡萄糖苷结合物和硫酸酯酶结合物,仅有少部分的游离化合物,因此,游离双酚 A 及结合双酚 A 的检测对评价双酚 A 的危险度具有重要的意义。本实验采用 - 葡萄糖酸酐酶和硫酸酯酶水解人尿液中的结合型壬基酚、辛基酚和双酚 A,使成游离型壬基酚、辛基酚和双酚 A,再进行检测,可以较为真实地反应人体被壬基酚、辛基酚和双酚 A 污染的情况。

3.1.2 SPE 萃取洗脱剂的选择 酶解后的尿液,冷却至室温,通过离心可去除尿液中的蛋白。其上清液加入到处理好的 OASIS HLB 柱,用水、20% 甲醇淋洗可去除水溶性杂质。由于 NP 和 OP 的极性较低, BPA 的极性相对较高,单纯使用甲醇或二氯甲烷无法同时洗脱三种目标化合物,用二氯甲烷 + 甲醇 (90 + 10) 溶液洗脱 SPE 柱,所得结果最理想。

#### 3.2 色谱条件的优化

3.2.1 色谱柱的选择 目前采用液相色谱方法对 BPA、OP 和 NP 分析时,基本采用反相色谱<sup>[6-8]</sup>。流动相以甲醇 + 水、乙腈 + 水体系为主,适当调节酸度。调节酸度所用的酸主要是乙酸或使用缓冲盐溶液。本实验考察了不同色谱柱 C<sub>18</sub>、C<sub>8</sub> 和苯基柱对 BPA、OP 和 NP 的分离效果。结果表明,使用 C<sub>18</sub> (载体粒度为 5 μm)、C<sub>8</sub> 和苯基柱时, BPA 基线分离,峰形对称,但 OP、NP 分离效果不好。使用 Waters XTerra™ MS C<sub>18</sub> (载体粒度为 3.5 μm) 时, BPA、OP、NP 基线分离,峰形对称,分离效果较好。此外,本实验研究表明,若在流动相中加入乙酸、三乙胺等调节 pH 值, OP、NP 峰形变胖,分离效果不理想。

3.2.2 流动相的选择 本实验采用 Waters XTerra™ MS C<sub>18</sub> 液相色谱柱分离,考察不同比例甲醇 + 水、乙腈 + 水作为流动相梯度洗脱的效果。结果表明,甲醇 + 水作为流动相的分离效果明显好于乙腈 + 水作为流动相的分离效果。

3.2.3 柱温的选择 比较柱温为 25、30、40 时 OP、NP 和 BPA 的分离和色谱峰形,结果表明,温度升高,保留时间减少,分离效果和色谱峰形无明显改变,故选择 25 作为检测温度。

#### 参考文献

- [1] KAWAGUCHI M, SAKUIN, OKANOUCHI N, et al. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 5:820(1):49-57.
- [2] DEL OLMO M, ZAFRA A, SUAREZ B, et al. Use of solid-phase microextraction followed by on-column silylation for determining chlorinated bisphenol A in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2005, 817(2):167-172.
- [3] 石峻岭, 杨水莲, 肖国兵, 等. 普通人群血清双酚 A 水平的测定 [J]. 环境与职业医学, 2004, 21(3):190-194.
- [4] INOUE K, KAWAGUCHI M, FUNAKOSHI Y, et al. Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 798(1):17-23.
- [5] YE X, KURLENYIK Z, NEEDHAM L L, et al. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk

论著

### 2003 - 2006 年全国家畜肾中镉污染水平监测研究

蒋定国 王竹天 杨大进 吴永宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**目的 调查我国家畜肾中镉的污染水平及其动态变化趋势,并评估其对健康的危害。方法 在严格的分析质量控制条件下,2003 - 2006 年全国食品污染物监测网在 14 个省市按照国家标准方法连续 4 年监测我国家畜肾中镉的含量。结果 4 年监测工作共收集了 2 325 个数据,结果表明猪肾中镉的总平均值为 2.820 mg/kg, P90 值为 4.979 mg/kg, P95 值为 11.90 mg/kg, P97.5 值为 24.80 mg/kg, 4 项指标都大大超过了国家限量标准,检出率为 96.85%,超标率为 30.96%,而牛和羊的各项指标都低于猪的。结论 我国家畜肾尤其是猪肾中镉污染比较严重,对于猪肾摄入量高的人群健康危害较大。

**关键词:**镉;肾;动物;家畜;食品污染;数据收集

#### Study on Continuous Monitoring of Contamination Level of Cadmium in Kidneys of Domestic Animals from 2003 to 2006 in China

JIANG Ding-guo, WANG Zhu-tian, YANG Da-jin, WU Yong-ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract : Objective** To investigate the contamination level and developing trend of cadmium in kidneys of domestic animals in China. **Method** Under the strict analysis quality control, contents of cadmium in kidneys of domestic animals were analyzed according to the national standard method in the fourteen provinces from the national food contamination monitoring system from 2003 to 2006. **Results** 2 325 data on contents of cadmium in kidneys of domestic animals were collected during four years, the results showed that the total average content of cadmium in kidneys of pigs was 2.820 mg/kg, P90 was 4.979 mg/kg, P95 was 11.90 mg/kg and P97.5 was 24.80 mg/kg. All of them greatly exceeded the national limit standard. The rate of positive samples exceeded 96.85%, the rate of violated samples exceeded 30.96%. But, those values of cattle and sheep were much lower than those of pig. **Conclusion** The cadmium contamination in kidneys of domestic animals was serious in whole country and the cadmium contamination in pig kidney was much higher. It was hazardous for people with high intake of kidneys of pigs.

**Key word:** Cadmium; kidney; Animals, Domestic; Food Contamination; Data Collection

using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 831 (1-2):110-115.

[6] 肖全伟,黎源倩,张浩,等.高效液相色谱法测定大鼠血清中 4-壬基酚和双酚 A[J]. 四川大学学报(医学版),2004,35(2):271-273.

[7] 韩灏,邵兵,马亚鲁,等.高效液相色谱法测定饮料类食品中的类雌激素[J]. 色谱,2005,23(2):176-179.

[8] BRAUNRATH R, PODLIPNA D, PADLESACK S, et al. Determination of BPA in canned foods by immunoaffinity chromatography, HPLC, and fluorescence detection[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53:8911-8917.

[收稿日期:2007 - 11 - 12]

中图分类号:R15;O657.72;O625.31 文献标识码:A 文章编号:1004 - 8456(2008)02 - 0111 - 04

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重大项目食品安全关键技术资助项目(2006BAK02A01)

作者简介:蒋定国 男 副研究员

通讯作者:吴永宁 男 研究员 博士生导师

