

纸尿裤尿液中激素分析方法的初步研究及应用

王恒¹, 鲍舟君²

1. 舟山市疾病预防控制中心, 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316021
2. 舟山医院检验中心, 浙江 舟山 316021

摘要:

[背景] 婴儿的环境内分泌干扰物暴露及健康效应已经引起了广泛的关注, 但是受采样方法所限, 婴儿体内激素水平的测定一直是大规模人群研究的难点。

[目的] 研究采用纸尿裤收集婴幼儿尿液是否可用于测定尿液中雌二醇 (E_2)、睾酮 (T)、促卵泡生成素 (FSH)、促黄体生成素 (LH) 的含量, 为开展婴儿出生后早期环境内分泌干扰物暴露评估建立基础。

[方法] 将含不同浓度的激素加标尿液 (E_2 : 146、219、292、365、438、584、730 pmol/L; T: 0.35、0.7、1.05、1.4、1.75、2.1、2.8 nmol/L; FSH 和 LH: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6 IU/L) 倾倒在某品牌纸尿裤, 使其充分吸收, 加氯化钙粉末释放纸尿裤吸附的尿液, 使用 Beckman Coulter UniCel™ DxI 800 全自动免疫分析系统测定尿液中 4 种激素的含量, 计算测量结果的准确度和精密度。将含不同浓度的激素 (E_2 : 1605.9、2049.9、2732.9 pmol/L; T: 1.79、2.50、3.20 nmol/L; FSH: 0.78、1.00、1.47 IU/L; LH: 0.47、0.61、0.83 IU/L) 的纸尿裤尿液样品于 -20°C 保存 0、30、100d 后测定 4 种激素的含量, 计算相对标准偏差 (RSD), 考察其保存的稳定性。随机选取前期在浙江岱山采集的 15 例婴儿 (男婴 8 例, 女婴 7 例) 出生后不同时期 (出生时, 出生后 14d、28d、42d、3 个月和 6 个月) 的纸尿裤, 测定尿液中 4 种激素的含量, 对方法进行初步验证。

[结果] 将激素加标尿液与纸尿裤释放尿液中 E_2 、T、FSH 和 LH 的浓度进行线性拟合, 在 146~730 pmol/L、0.35~2.8 nmol/L、0.2~1.6 IU/L 和 0.2~1.6 IU/L 范围内, 线性关系良好, 决定系数 (R^2) 分别为 0.956、0.979、0.997 和 0.991; 在不同激素水平下, 4 种激素的平均回收率 (R) 分别为 95.4%、98.3%、69.7% 和 39.3%, RSD 在 5.5%~21.6% 之间; -20°C 条件下, 不同浓度的 4 种激素在不同保存时间下的精密度在 7.7%~31.0% 之间。15 例婴儿尿液中 E_2 、T、FSH 和 LH 含量范围分别为 ND~44 178 pmol/L、ND~44.37 nmol/L、ND~11.64 IU/L 和 ND~8.88 IU/L。

[结论] 该方法可较好地测定婴儿出生后早期尿液中 E_2 、T、FSH 和 LH 的含量, 可考虑进一步应用于环境内分泌干扰物暴露对婴幼儿出生早期的内分泌干扰效应研究。

关键词: 纸尿裤; 婴儿; 尿液; 激素; 环境内分泌干扰物

A preliminary methodological and application study on determining urine hormones from disposable diapers WANG Heng¹, BAO Zhou-jun² (1. Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, Zhoushan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhoushan, Zhejiang 316021, China; 2. Testing Center, Zhoushan Hospital, Zhoushan, Zhejiang 316021, China)

Abstract:

[Background] Infants' exposure to environmental endocrine disruptors has raised great concern. But due to the limits of sampling techniques, it is difficult to measure the hormone levels of infants in large cohort studies.

[Objective] The study is designed to determine whether the urine collected by disposable diapers can be used to measure the concentrations of 17β -estradiol (E_2), testosterone (T), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH) in urine of infants, and to establish a basis for the assessment of environmental endocrine disruptor exposure in early postnatal period.

[Methods] The urine with different spike levels of hormones (E_2 : 146, 219, 292, 365, 438, 584, and 730 pmol/L; T: 0.35, 0.7, 1.05, 1.4, 1.75, 2.1, and 2.8 nmol/L; FSH and LH: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, and 1.6 IU/L) were poured into dry disposable diapers of a selected brand and absorbed completely. After the absorbed urine was collected with CaCl_2 powder, the concentrations of four hormones in urine were measured with Beckman Coulter UniCel™ DxI 800 Access Immunoassay System, and

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19324

基金项目

浙江省自然科学基金 (LY14B070005); 浙江省医药卫生科技计划面上项目 (2019KY741); 舟山市科技计划项目 (2016C31032); 舟山市医药卫生科技计划 (2016A18)

作者简介

王恒 (1981—), 男, 博士, 副主任技师; E-mail: 380281445@qq.com

通信作者

王恒, E-mail: 380281445@qq.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-05-14

录用日期 2019-09-24

文章编号 2095-9982(2019)11-1001-06

中图分类号 R446.12

文献标志码 A

引用

王恒, 鲍舟君. 纸尿裤尿液中激素分析方法的初步研究及应用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (11): 1001-1006.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19324

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Heng, E-mail: 380281445@qq.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-05-14

Accepted 2019-09-24

To cite

WANG Heng, BAO Zhou-jun. A preliminary methodological and application study on determining urine hormones from disposable diapers[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(11): 1001-1006.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19324

the accuracy and precisions of the results were calculated. The stability of the four hormones at different levels (E_2 : 1 605.9, 2 049.9, and 2 732.9 pmol/L; T: 1.79, 2.50, and 3.20 nmol/L; FSH: 0.78, 1.00, and 1.47 IU/L; LH: 0.47, 0.61, and 0.83 IU/L) after different storage periods (0, 30, and 100 d) at -20°C was also investigated by calculating the relative standard deviations (RSD). Wet disposable diaper samples were collected at different ages (at birth, 14 d, 28 d, 42 d, 3 months, and 6 months) of 15 infants (eight male infants and seven female infants) who were selected randomly from a cohort study implemented earlier in Daishan, Zhejiang Province, and were analyzed for the four hormones by the established method for preliminary verification.

[Results] E_2 (146-730 pmol/L), T (0.35-2.8 nmol/L), FSH (0.2-1.6 IU/L), and LH (0.2-1.6 IU/L) in standard urine and the urine collected from wet disposable diapers all showed good linearity with determination coefficients (R^2) of 0.956, 0.979, 0.997, and 0.991, respectively. The average recoveries of the four kinds of hormones at different spike levels were 95.4%, 98.3%, 69.7%, and 39.3%, respectively, with RSDs between 5.5%-21.6%. The RSDs were between 7.7%-31.0% of the four hormones stored at -20°C over different periods. The concentrations of E_2 , T, FSH, and LH of 15 infants were between ND-44 178 pmol/L, ND-44.37 nmol/L, ND-11.64 IU/L, and ND-8.88 IU/L, respectively.

[Conclusion] This method can be used to measure the concentrations of E_2 , T, FSH, and LH in urine of infants in early postnatal period, and may be applied to studies on the endocrine disrupting effects in infants exposed to environmental endocrine disruptors.

Keywords: disposable diaper; infant; urine; hormone; environmental endocrine disruptor

环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EEDs) 进入人体后, 能够激活或抑制内分泌系统的功能^[1], 婴儿人群暴露于该类物质的潜在负面健康影响日益受到广泛关注。

微小青春期是婴儿出生之后随即经历的一个促性腺激素 [促卵泡生成素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH)] 和性激素 [雌二醇 (17β -estradiol, E_2)、睾酮 (testosterone, T)] 分泌快速上升的发育期。在此时期, 婴儿血清中的性激素水平迅速上升至峰值, 随后会快速下降^[2-4]。微小青春期对婴儿后续的身体发育是否有影响, 目前尚无定论。婴儿期的环境内分泌干扰物暴露是否会干扰婴儿体内激素平衡, 进而影响婴儿正常的生长发育, 是一个值得高度关注的课题, 这其中的首要任务是要能准确测定该时期婴儿体内的激素水平。

传统的体内激素水平测定方法是通过测定血液激素浓度来实现^[5-7], 但是对于开展大规模的婴儿人群暴露研究而言, 同一婴儿的多次血样采集存在一定的难度。由于临床上也可通过测定尿液中 E_2 、T、FSH、LH 来进行医学诊断, 若能收集婴儿废弃的尿液, 通过测定婴儿尿液中激素含量的变化来反映婴儿体内激素水平的变化, 则是一个较为可行的办法。而对于大规模人群的调查研究而言, 婴儿尿液的有效采集也是一个难点。有文献报道使用专门的尿袋^[8]或在纸尿裤中预先塞入棉纱布^[9]来收集婴儿尿液, 但这些方法会使大规模人群调查的工作量大量增加。若能利用婴儿日常使用的纸尿裤来收集尿液, 则会使样品采集工作变得极为便利。已有文献报道利用纸尿裤收集婴儿尿液后, 采用液相色谱-串联质谱法能够准确测定婴儿尿液中的雌酮和 E_2 等物质^[10]及肌酐^[11]的含量, 但前处理方法过于烦琐, 在大规模人群研究时面临较大的

困难。另外, T、FSH 和 LH 是否可用此方法测定并无研究, 而这 3 种激素和 E_2 是微小青春期的 4 种主要激素, 因此应建立婴儿尿液中此 4 种激素更易操作的检测方法。本研究利用纸尿裤收集婴儿尿液, 结合化学发光免疫分析技术测定婴儿尿液中 4 种激素 (E_2 、T、FSH、LH) 的含量, 并用实际样品进行方法验证, 以期为进一步的婴儿人群内分泌干扰物暴露评估建立基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

全自动免疫分析系统 (型号: UniCel™ DxI 800)、全自动生化分析仪 (型号: AU 5800)、高速冷冻离心机 (Beckman Coulter, 美国), 氮吹仪 (上海安谱, 中国), 电子天平 (Sartorius, 德国)。

某品牌纸尿裤, 氯化钙 (Merck, 德国), 正己烷 (上海安谱, 中国), 超纯水 (Millipore, 美国), 氯化钠 (国药集团, 中国), E_2 、T (Dr. Ehrenstorfer, 德国), FSH、LH (Beckman Coulter, 美国)。

空白尿液制备: 随机取 5 份成人尿液, 每份 250 mL 混合后, 取 1 L 混合尿液, 按 1% (质量分数) 的比例添加活性炭粉末, 4°C 搅拌过夜, 过滤去除活性炭后得空白尿液。

0.9% 氯化钠溶液配制: 称取氯化钠固体 9.0 g, 加超纯水 1.0 L, 混匀。

1.2 方法

1.2.1 尿液的释放 使用干净的手术剪刀从纸尿裤背面剪开纸尿裤, 取饱含尿液的纸尿裤胶质 20.0 g 于 50 mL 玻璃小烧杯中, 按质量比 50:1 ($m_{\text{含尿液纸尿裤胶质}}/m_{\text{氯化钙}}$) 的比例添加氯化钙粉末, 充分混合搅拌, 静置 0.5 h 后, 使用自制的砂芯漏斗将释放出的尿液以转速 $233\times g$ 离心 10 min, 与纸尿裤胶质分离, 再用 5.0 mL 正己烷

清洗砂芯漏斗中残余的纸尿裤胶质, 转速 $233\times g$ 离心 10 min, 将分离出的液体与前述分离出的尿液合并, 30°C 温和氮气吹干正己烷, 涡旋混匀^[10, 12]。

1.2.2 释放尿液中 4 种激素的回收率 以 0.9% 氯化钠溶液逐级稀释配制 E_2 、T、FSH 和 LH 标准使用液 (分别为 0.1 mg/L、1.0 mg/L、200 IU/L、250 IU/L), 再分别吸取适量激素标准使用液于空白尿液中, 并定容至 100 mL, 得 7 个不同浓度的 4 种激素加标尿液 (E_2 : 146、219、292、365、438、584、730 pmol/L; T: 0.35、0.7、1.05、1.4、1.75、2.1、2.8 nmol/L; FSH 和 LH: 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.6 IU/L), 考察线性范围。使用 100 mL 注射器将加标尿液缓缓注入纸尿裤中心位置, 静置 0.5 h 待其充分吸收, 再按 1.2.1 中的方法释放纸尿裤中的尿液, 得到纸尿裤释放尿液。使用 Beckman Coulter UniCel™ DxI 800 全自动免疫分析系统同时测定配制的加标尿液以及纸尿裤释放尿液中 4 种激素的含量。释放尿液时, 在纸尿裤中任意位置随机选取 3 份饱含尿液的纸尿裤胶质进行释放。回收率 (recovery, R) 以释放尿液中激素含量 (hormone concentration in released urine, C_r) 与原尿液中激素含量 (hormone concentration in original urine, C_o) 的比值来表示。由于采用了多个浓度进行释放, 将不同浓度的 C_r 与 C_o 进行一次线性回归拟合后, 回归方程的斜率即为平均回收率 $R^{[11]}$, 其中 C 为常数项。

$$C_r = R \times C_o + C \quad \text{公式 (1)}$$

1.2.3 释放尿液中 4 种激素含量的精密度 以相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 来表示尿液释放过程中可能产生的激素含量的变异。在不同激素含量水平 (E_2 : 146、365、730 pmol/L; T: 0.7、1.75、3.5 nmol/L; FSH 和 LH: 0.4、1.0、2.0 IU/L) 下, 每次分别在纸尿裤不同位置随机选取 6 份饱含尿液的纸尿裤胶质, 按前述步骤释放纸尿裤胶质中的尿液, 计算释放尿液中 4 种激素含量的 RSD 。

1.2.4 常规保存条件下纸尿裤尿液中 4 种激素的稳定性 选取 3 份不同激素水平 (E_2 : 1605.9、2049.9、2732.9 pmol/L; T: 1.79、2.50、3.20 nmol/L; FSH: 0.78、1.00、1.47 IU/L; LH: 0.47、0.61、0.83 IU/L) 的纸尿裤样品, 在 -20°C 条件下冷冻保存, 分别在第 1 天 (尿液吸附当天, 未经冻融过程)、第 30 天和第 100 天时取样释放尿液, 比较不同保存时长 (即分别保存 0 d、30 d 和 100 d) 下释放尿液中 4 种激素含量的变化情况。每次释放尿液时均在纸尿裤的不同位置随机取样 3 份, 计算

平均值 ($mean$) 及标准偏差 (SD)。稳定性以 RSD 表示, 此处 RSD 的计算是将 3 个不同保存时间 (共 9 个重复) 的测定结果作为一个整体进行计算。

1.2.5 方法应用 于 2012 年 3 月—2014 年 12 月间在浙江省岱山县征集孕妇 252 例, 随机选取 15 例婴儿 (7 名女婴, 8 名男婴), 分别在婴儿出生时、出生后 14 d、28 d、42 d、3 个月和 6 个月时收集 1 份婴儿夜间尿液, 由婴儿母亲将婴儿清晨换下的夜间纸尿裤带至岱山县妇保所, 并立即置于 -20°C 冰柜冷冻保存, 随后每周低温运送至舟山市疾病预防控制中心, -20°C 保存并按 1.2.1 中的方法释放尿液并测定 4 种激素的含量, 同时采用 Beckman Coulter AU 5800 全自动生化分析仪测定肌酐含量。整个实验研究经舟山市疾病预防控制中心医学伦理委员会审查, 符合《赫尔辛基宣言》(2013)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对男婴和女婴尿液中 4 种激素经肌酐校正后含量的差异进行两因素析因设计资料的方差分析。激素浓度低于定量限 (limit of quantification, LOQ) 时, 采用 $1/2$ LOQ 代替。双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 释放尿液中 4 种激素的回收率、线性范围及决定系数

将加标尿液中 4 种激素的测定浓度与纸尿裤释放尿液中 4 种激素的测定浓度进行一次线性回归拟合, E_2 、T、FSH、LH 分别在 146~730 pmol/L、0.35~2.8 nmol/L、0.2~1.6 IU/L 和 0.2~1.6 IU/L 范围内呈现较好的线性关系, 决定系数 R^2 分别为 0.956、0.979、0.997 和 0.991。4 种激素的平均回收率 (R) 分别为 95.4%、98.3%、69.7% 和 39.3% (表 1)。由于本方法是在 Beckman Coulter 公司的全自动免疫分析系统的基础上开展的方法验证, 因此本方法以该产品说明书中的 LOQ 为准, 分别为 73 pmol/L、0.35 nmol/L、0.2 IU/L、0.2 IU/L。

2.2 释放尿液中 4 种激素含量的精密度

在不同激素水平下 (E_2 : 146、365、730 pmol/L; T: 0.7、1.75、3.5 nmol/L; FSH 和 LH: 0.4、1.0、2.0 IU/L), 4 种激素含量的 RSD 值在 5.5%~21.6% 之间, 其中 E_2 分别为 9.4%、5.5%、9.4%, T 分别为 10.0%、8.5%、11.1%, FSH 分别为 18.2%、11.9%、13.1%, LH 分别为 21.6%、11.0%、9.4%, 能够满足分析的要求^[13]。

表 1 纸尿裤尿液中 4 种激素回收率线性拟合回归方程、线性范围和决定系数

Table 1 Regression equations, linear ranges, and determination coefficients of four hormones in urine collected from wet disposable diapers

分析物 Analyte	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range	决定系数 (R^2) Determination coefficient
雌二醇 (17 β -estradiol, E ₂)	$\hat{y}=0.95432x-430.94844$	146~730 pmol/L	0.956
睾酮 (Testosterone, T)	$\hat{y}=0.98331x+0.07714$	0.35~2.8 nmol/L	0.979
促卵泡生成素 (FSH) Follicle-stimulating hormone	$\hat{y}=0.69737x+0.06775$	0.2~1.6 IU/L	0.997
促黄体生成素 (LH) Luteinizing hormone	$\hat{y}=0.39257x+0.01188$	0.2~1.6 IU/L	0.991

2.3 常规保存条件下纸尿裤尿液中 4 种激素的稳定性

由表 2 可见, 在不同激素水平下, 4 种激素的 *RSD* 在 7.7%~31.0% 之间, 除 LH 的 *RSD* 略高以外, 其他 3 种激素在不同保存时间下的 9 个重复测定值的 *RSD* 均小

于 25%。总体而言, 4 种激素在常规保存条件下稳定性良好^[11, 13]。

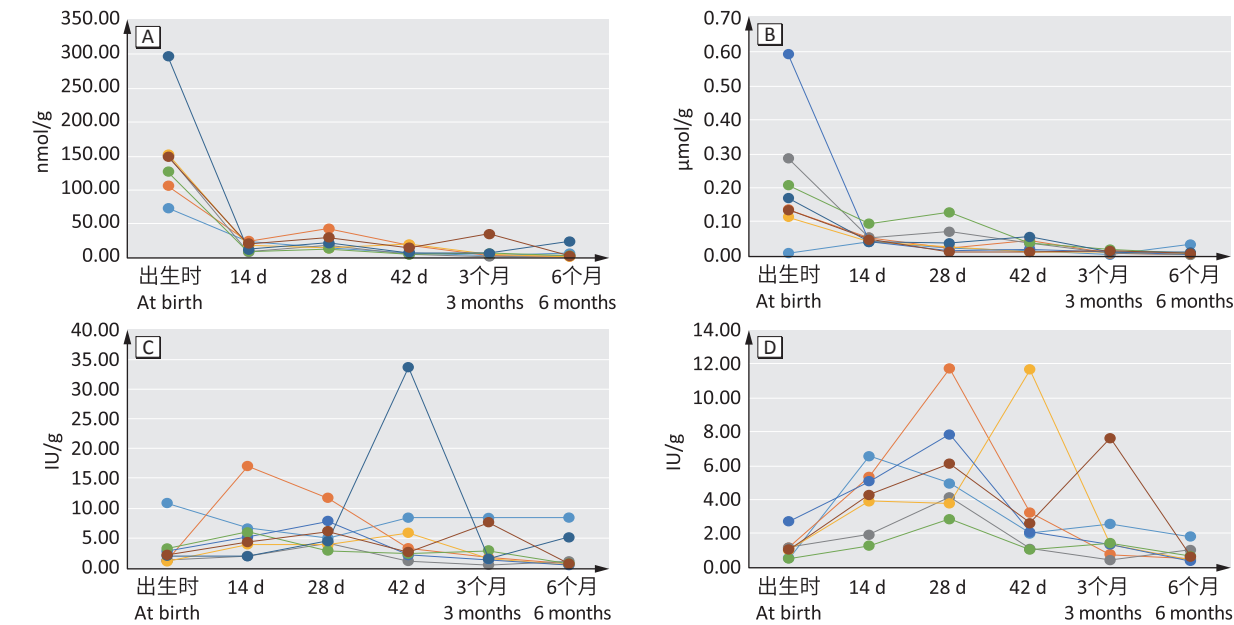
2.4 实际样品测定

15 例婴儿不同时点纸尿裤尿液中 E₂、T、FSH、LH 的含量范围分别在 ND~44 178 pmol/L、ND~44.37 nmol/L、ND~11.64 IU/L 和 ND~8.88 IU/L 之间。将男婴和女婴经肌酐校正的尿液激素含量分别绘制折线图 (图 1 和图 2), 可见不论是男婴还是女婴, 出生时尿液中 E₂ 和 T 的含量达高点, 随后迅速下降。而对于 FSH 和 LH 而言, 峰值出现在出生后 14~42 d 范围内。对 E₂、T、FSH、LH 进行性别和时间交互作用的析因方差分析, 显示 LH 的结果有统计学意义 ($F=2.729$, $P=0.025$), 可以认为性别和时间对 LH 有交互作用。

表 2 纸尿裤尿液中激素在 -20℃ 保存时的稳定性 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Stability of hormones in urine collected from wet disposable diapers stored at -20℃

分析物 (Analyte)	水平 (Level)	第 1 天 (1st day, n=3)	第 30 天 (30th day, n=3)	第 100 天 (100th day, n=3)	合计 (Total, n=9)	<i>RSD</i> (% , n=9)
雌二醇 (17 β -estradiol, E ₂ , pmol/L)	1	1407.7 $\pm$ 192.7	1614.7 $\pm$ 181.9	1795.3 $\pm$ 102.5	1605.9 $\pm$ 220.0	13.7
	2	1764.7 $\pm$ 75.7	2222.3 $\pm$ 192.7	2162.7 $\pm$ 94.7	2049.9 $\pm$ 243.7	11.9
	3	2301.7 $\pm$ 168.6	2641.3 $\pm$ 96.4	3255.7 $\pm$ 423.5	2732.9 $\pm$ 479.2	17.5
睾酮 (Testosterone, T, nmol/L)	1	1.60 $\pm$ 0.14	1.81 $\pm$ 0.35	1.95 $\pm$ 0.13	1.79 $\pm$ 0.25	14.1
	2	2.37 $\pm$ 0.22	2.51 $\pm$ 0.05	2.62 $\pm$ 0.23	2.50 $\pm$ 0.19	7.7
	3	2.95 $\pm$ 0.17	3.17 $\pm$ 0.03	3.47 $\pm$ 0.46	3.20 $\pm$ 0.33	10.4
促卵泡生成素 (Follicle-stimulating hormone, FSH, IU/L)	1	0.63 $\pm$ 0.08	0.79 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.14	18.3
	2	0.91 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.05	1.13 $\pm$ 0.18	1.00 $\pm$ 0.14	13.6
	3	1.15 $\pm$ 0.01	1.39 $\pm$ 0.18	1.88 $\pm$ 0.15	1.47 $\pm$ 0.34	23.3
促黄体生成素 (Luteinizing hormone, LH, IU/L)	1	0.34 $\pm$ 0.03	0.42 $\pm$ 0.06	0.64 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.14	31.0
	2	0.56 $\pm$ 0.07	0.66 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.25	0.61 $\pm$ 0.14	22.2
	3	0.68 $\pm$ 0.20	0.93 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.39	0.83 $\pm$ 0.25	30.1

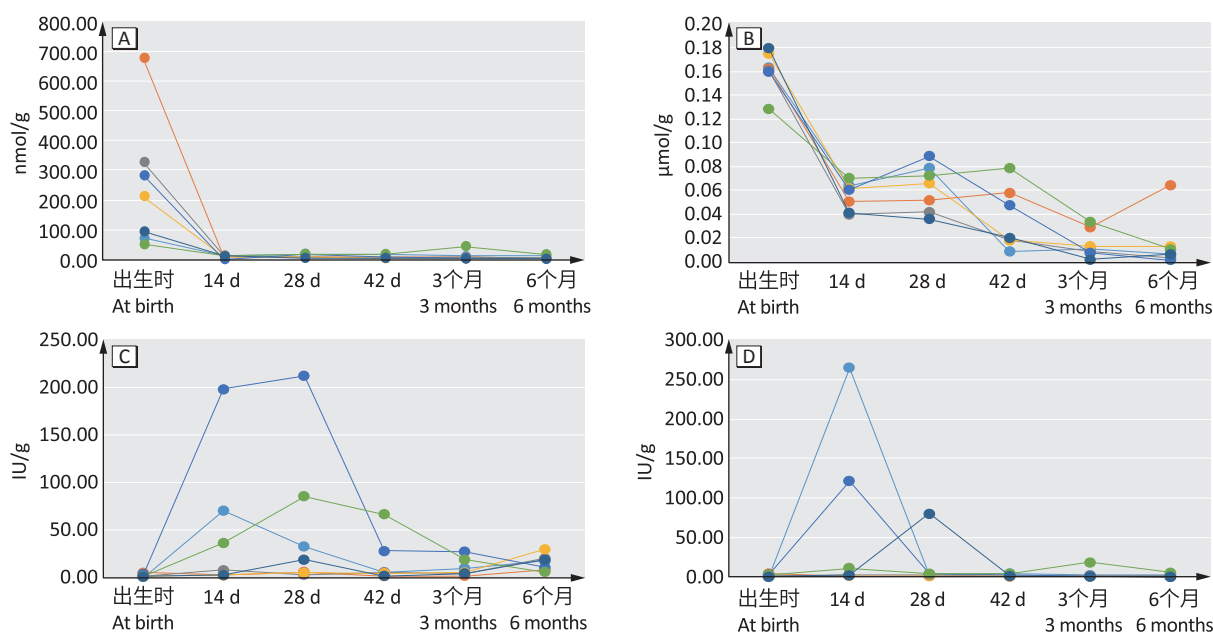


[注] A: 雌二醇 (E₂); B: 睾酮 (T); C: 促卵泡生成素 (FSH); D: 促黄体生成素 (LH)。不同颜色表示不同男婴。A 和 D 中各删去 1 例男婴的数据 (出现离群值)。图中数据为经肌酐校正后数值。

[Note] A: 17 β -estradiol; B: Testosterone; C: Follicle-stimulating hormone; D: Luteinizing hormone. Different colors represent different male infants. Data of one male infant are deleted in A and D, respectively (outliers). Data in the figure are adjusted by creatinine.

图 1 男性婴儿纸尿裤尿液中不同时期 4 种激素的变化趋势 (n=8)

Figure 1 Profiles of four kinds of hormones in urine of male infants collected by wet disposable diapers



[注] A: 雌二醇 (E_2) ; B: 睾酮 (T) ; C: 促卵泡生成素 (FSH) ; D: 促黄体生成素 (LH)。不同颜色表示不同女婴。图中数据为经肌酐校正后数值。
[Note] A: 17β -estradiol; B: Testosterone; C: Follicle-stimulating hormone; D: Luteinizing hormone. Different colors represent different female infants. Data in the figure are adjusted by creatinine.

图2 女性婴儿纸尿裤尿液中不同时期4种激素的变化趋势 ($n=7$)

Figure 2 Profiles of four kinds of hormones in urine of female infants collected by wet disposable diapers

3 讨论

使用纸尿裤收集婴儿尿液,属于非侵入性样品采样。就采样方法而言,本方法比传统的血液检测方法具有一定的优势。同时,本方法利用化学发光免疫分析技术测定4种激素含量,与文献^[10]报道的使用液相色谱-串联质谱法检测相比,检测过程大为简化,有利于大规模人群调查研究工作的开展。并且,与类似文献的比较表明,本方法可以较好地反映婴儿体内激素水平的变化^[2, 14-15]。虽然FSH和LH的回收率相对较低,分别为69.7%和39.3%,但是得益于较好的精密度,应用该方法仍可反映婴儿体内FSH和LH激素水平的变化趋势。 -20°C 冰箱是基层单位常用的仪器设备,收集的纸尿裤在 -20°C 条件下可稳定保存100 d,这为开展大规模的人群调查提供了极为便利的基础。

15例婴儿的尿液检测结果显示,婴儿出生后的激素水平变化存在一定的规律。 E_2 和T的峰值点均在出生时,随后迅速下降,这一变化趋势与部分文献^[2, 14-15]的报道一致。De Jong等^[14-15]的报道显示男性婴儿和女性婴儿出生后早期的FSH和LH的峰值点均出现在出生后第4周(第21~28 d),Winter等^[4]报道FSH含量峰值点在出生后1周~3个月,这些结果与本文显示的婴儿出生后FSH的峰值点在出生后14~28天、LH的峰值点在出生后14天较为吻合,但是与Winter等^[4]报道

的LH含量峰值点在出生后2~3个月差异较大。此外,Kuiri-hänninen等^[16-17]报道婴儿出生后睾酮的峰值点出现在出生后1~3个月,这与本文的结果也有较大的差别。这些差别的原因可能是因为研究人群的差异,也可能是单次血液采样导致的误差。这提示采用纸尿裤进行多点采样,可能可以更好地反映婴儿体内激素水平的变化。

E_2 和T的回收率较好,而FSH和LH的回收率相对较低,这可能是因为 E_2 和T均为小分子化合物,在尿液释放过程中能够保持稳定,而FSH和LH均为含有2个亚基的蛋白质,在尿液释放回收的过程中可能发生了某种程度的蛋白质构象改变。Beckman Coulter UniCel™ Dxl 800全自动免疫分析系统是通过免疫吸附的原理进行测定的,对于构象发生改变的蛋白质可能无法准确测定,这可能是其回收率偏低的主要原因。因此,特别是针对LH,进一步改进尿液的释放条件,提高蛋白质类激素的回收率,是一个值得进一步研究的问题。另外,本研究尚未能够将尿液激素水平与血液激素水平进行同时测定对比,这也有待于进一步验证。

综上所述,该方法可以较为准确地测定释放尿液中 E_2 、T、FSH和LH的含量,能够初步描绘出婴儿出生后早期尿液中这4种激素的变化趋势,可考虑使用该方法大规模多时间点采集婴儿尿液,进一步应用于环

境内分泌干扰物暴露对婴幼儿出生后早期的内分泌干扰效应研究。

参考文献

- [1] 陶舒曼, 陶芳标. 孕期环境暴露与儿童发育和健康 [J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50 (2): 192-197.
- [2] BIDLINGMAIER F, WAGNER-BARNACK M, BUTENANDT O, et al. Plasma estrogens in childhood and puberty under physiologic and pathologic conditions [J]. *Pediatr Res*, 1973, 7 (11): 901-907.
- [3] KURTOĞLU S, BAŞTUĞ O. Mini puberty and its interpretation [J]. *Turk Pediatri Ars*, 2014, 49 (3): 186-191.
- [4] WINTER JS, FAIMAN C, HOBSON WC, et al. Pituitary-gonadal relations in infancy. I. patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1975, 40 (4): 545-551.
- [5] 季钗, 潘斌华, 王旭, 等. 健康婴儿LH、FSH、雌二醇与睾酮的血清浓度 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 21 (6): 514-517.
- [6] 赵华, 宗春燕, 周振, 等. 900 MHz微波辐射对雄性大鼠血浆激素水平昼夜节律的影响 [J]. 环境与职业医学, 2012, 29 (12): 735-738.
- [7] 黄振, 汪一心, 鲁文清. 男性精浆17种金属浓度与血清生殖激素水平的关系 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (4): 297-303.
- [8] ADIBI JJ, WHYATT RM, WILLIAMS PL, et al. Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples [J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116 (4): 467-473.
- [9] HU YA, BARR DB, AKLAND G, et al. Collecting urine samples from young children using cotton gauze for pesticide studies [J]. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 2000, 10 (6): 703-709.
- [10] LIU L, XIA T, ZHANG X, et al. Biomonitoring of infant exposure to phenolic endocrine disruptors using urine expressed from disposable gel diapers [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2014, 406 (20): 5049-5054.
- [11] LIU L, XIA T, GUO L, et al. Expressing urine from a gel disposable diaper for biomonitoring using phthalates as an example [J]. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2012, 22 (6): 625-631.
- [12] 王恒. 双酚A暴露影响婴幼儿微小青春期和身体发育的风险研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2017.
- [13] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry [EB/OL]. [2019-05-14]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>.
- [14] DE JONG M, ROTTEVEEL J, HEIJBOER AC, et al. Urine gonadotropin and estradiol levels in female very-low-birth-weight infants [J]. *Early Hum Dev*, 2013, 89 (3): 131-135.
- [15] DE JONG M, ROTTEVEEL J, HEIJBOER AC, et al. Urine gonadotropin and testosterone levels in male very-low-birthweight infants [J]. *Horm Res Paediatr*, 2012, 78 (3): 173-179.
- [16] KUIRI-HÄNNINEN T, SANKILAMPI U, DUNKEL L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty [J]. *Horm Res Paediatr*, 2014, 82 (2): 73-80.
- [17] KUIRI-HÄNNINEN T, SEURI R, TYRVÄINEN E, et al. Increased activity of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in infancy results in increased androgen action in premature boys [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96 (1): 98-105.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 龚士洋, 陈姣; 校对: 韩凤婵)