

气相色谱串联质谱法测定尿中四种氯酚含量

王冰霜^{1a}, 单晓梅^{1a, 2}, 张兵², 张驰^{1b}, 金昱^{1b}, 黄芬^{1b}

摘要: [目的] 建立同时测定尿液中2-氯酚、2, 4-二氯酚、2, 4, 6-三氯酚及五氯酚4种氯酚的气相色谱串联质谱(GC-MS/MS)方法。[方法] 尿样经盐酸水解结合型氯酚, 液液萃取法(LLE)提取, 乙酸酐衍生化, 采用GC-MS/MS检测, 内标法定量。[结果] 采用人工模拟尿样作为空白, 基质匹配标准条件下, 2-氯酚、2, 4-二氯酚、2, 4, 6-三氯酚及五氯酚分别在0.50~100.0、0.50~100.0、0.50~100.0 μg/L和1.0~100.0 μg/L的范围内均具有良好的线性关系, 相关系数均大于0.999。方法的检出限为0.1~0.3 μg/L, 回收率为88.8%~118.2%, 相对标准偏差(RSD)为1.3%~5.5%。[结论] 本方法操作简便、准确度高、重现性好, 适用于尿样中多种氯酚含量的检测。

关键词: 氯酚; 尿; 乙酰化; 液液萃取; 气相色谱串联质谱

Determination of Four Chlorophenols in Human Urine by Gas Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry WANG Bing-shuang^{1a}, SHAN Xiao-mei^{1a, 2}, ZHANG Bing², ZHANG Chi^{1b}, JIN Yu^{1b}, HUANG Fen^{1b} (1.a.Department of Occupational and Environmental Health b.Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Anhui 230032, China; 2.Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Anhui 230601, China). Address correspondence to SHAN Xiao-mei, E-mail: xiaomeishan@126.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a method for simultaneous determination of four chlorophenols including 2-chlorophenol (2-CP), 2, 4-dichlorophenol (2, 4-DCP), 2, 4, 6-trichlorophenol (2, 4, 6-TCP), and pentachlorophenol (PCP) in human urine by gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). [Methods] Urine samples were hydrolyzed with hydrochloric acid, extracted by liquid-liquid extraction (LLE) method, and then derivatized using acetic anhydride. The products were detected by GC-MS/MS and quantified by internal standard method. [Results] Using artificial urine as urine blank and matrix for matched calibration, good linear relationships were obtained in the range of 0.50-100.0, 0.50-100.0, 0.50-100.0 μg/L, and 1.0-100.0 μg/L for 2-CP, 2, 4-DCP, 2, 4, 6-TCP, and PCP, respectively. Correlation coefficients were all greater than 0.999. Limits of detection ranged from 0.1 μg/L to 0.3 μg/L. Recoveries were between 88.8% and 118.2% with relative standard deviations in the range of 1.3% to 5.5%. [Conclusion] The method is featured by simple operation, high accuracy, and good repeatability to detect multiple chlorophenols in human urine samples.

Key Words: chlorophenol; urine; acetylation; liquid-liquid extraction; gas chromatography-tandem mass spectrometry

氯酚(chlorophenols, CPs)被广泛用作杀菌剂、杀虫剂和木材防腐剂等。在我国,五氯酚(PCP)及其钠盐被长期大量用作灭钉螺剂来控制血吸虫病。大量CPs的使用已造成了水环境的污染,人体通过饮用水、土壤及食物等途径暴露于CPs。研究表明,在人体,酚

类化合物主要以葡萄糖苷酸和硫酸盐的结合形式通过尿液及粪便排出^[1],尿样中酚类化合物特别是CPs的总浓度(游离酚及结合态酚类)可作为人体内暴露的一项指征^[2]。

因此,建立高效的检测尿中CPs的方法,对于暴露于CPs的人群生物监测、暴露评估和风险评估尤为重要。目前,国内外针对CPs检测方法的研究大多集中于水环境CPs的检测,对尿样CPs含量的方法研究较少。据文献报道^[3-4],结合型代谢物的水解方法分为酸化水解和酶解,其中酸水解因其简单可靠被得到广泛应用。尿样中CPs的前处理方法主要为液液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)等,SPE被广泛用于样品

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.15282

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81373071)

[作者简介] 王冰霜(1989—),女,硕士生;研究方向:环境卫生学;

E-mail: wang111090@163.com

[通信作者] 单晓梅, E-mail: xiaomeishan@126.com

[作者单位] 1.安徽医科大学公共卫生学院 a.劳动卫生与环境卫生学系 b.流行病与卫生统计学系,安徽 230032; 2.安徽省疾病预防控制中心,安徽 230601

中痕量组分的富集,但LLE方法可省去SPE柱的活化过程及样品上柱的时间,且分析的生物样品为人体的尿液,考虑到操作人员的耐受性,LLE方法更具优势。分析方法主要包括气相色谱法(GC)^[5]、气相色谱质谱联用法^[6-9]、超高效液相色谱法(UPLC)^[10]及液相色谱串联质谱法^[11]。CPs极性较强,液相色谱法可不经衍生化而直接检测,但易产生色谱峰拖尾。气相色谱法虽需要衍生化,但能够使酚类化合物得到更好地分离,具有更高的灵敏度。本实验采用盐酸水解尿样中结合型CPs,经LLE法提取,乙酸酐衍生化,气相色谱串联质谱仪测定,内标法定量。依靠高效的多重反应监测(MRM)功能,噪音低,灵敏度高,可有效简化前处理步骤,适用于尿液中痕量CPs的检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 7000B Triple Quad型三重四级杆气相色谱-质谱仪(美国安捷伦公司);色谱柱:HP-5MS(30m×0.25mm×0.25μm);Milli Q超纯水系统(Millipore,美国)。正己烷(色谱纯);浓盐酸(优级纯);乙酸酐、无水硫酸钠、无水碳酸钾(K₂CO₃)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠(NaCl)、尿素、葡萄糖均为分析纯,购自国药集团化学试剂公司;标准品:2-氯酚(2-CP, 1.02 mg/mL),2,4-二氯酚(2,4-DCP, 1.02 mg/mL),2,4,6-三氯酚(2,4,6-TCP, 1.02 mg/mL),五氯酚(PCP, 1.02 mg/mL)及内标液:2,4,6-三溴苯酚(2,4,6-TBP, 100 mg/L)均购自AccuStandard公司,4℃冰箱中保存备用。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 柱升温程序:初始柱温50℃,保持3 min,以20℃/min升至280℃,保持3 min;进样口温度250℃;载气:氦气(纯度≥99.999%),流速1 mL/min;不分流进样,进样量1 μL。

1.2.2 质谱条件 离子化方式:EI,标准电子能量为70 eV;质谱扫描范围:50~500 amu;离子源温度:230℃;传输线温度:250℃;多反应监测模式(MRM)。

1.3 标准工作液的配制

本实验的标准曲线采用基质匹配标准曲线,基质为人工模拟尿。取10 mL人工模拟尿,0.2 mol/L K₂CO₃溶液调pH约为8~9,分别加入一定量100 μg/L 4种氯酚的混标溶液,100 μL 5 mg/L 2,4,6-TBP内标溶液,1 mL乙酸酐,置于60℃水浴衍生化30 min,之后加入

10 mL正己烷分两次提取,得到浓度分为0.50、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μg/L的CPs衍生化产物。内标物2,4,6-TBP的浓度添加水平为50.0 μg/L。

人工模拟尿的配制^[12]:取磷酸氢二钠3 g,磷酸二氢钾0.75 g,氯化钠10 g,尿素10 g,葡萄糖20 g,去离子水定容至250 mL,取该溶液按1:10(V:V)比例用去离子水稀释成人工模拟尿样工作液。

1.4 样品的采集与保存

使用50 mL聚乙烯管收集尿液,按50 mL尿样加1~2滴浓盐酸,置于4℃冰箱中保存,一周内尽快测定。

1.5 尿样的前处理

取10 mL尿样,加入浓盐酸调pH为1~2,加入100 μL 5 mg/L 2,4,6-TBP内标液,加入固体NaCl至饱和,涡旋振荡混匀,10 mL正己烷分两次提取,取上清液置于另一离心管,加入100 μL 0.2 mol/L K₂CO₃溶液,1 mL乙酸酐,60℃水浴30 min衍生化,经无水硫酸钠脱水后待测。

1.6 统计学分析

本实验采用内标法定量,以人工模拟尿样中各组分衍生化产物的浓度(μg/L)为横坐标,以测得的各组分衍生化产物的色谱峰面积与内标化合物的峰面积比值为纵坐标,绘制标准曲线。将测得的样品中组分衍生化产物峰面积与内标峰面积的比值代入标准曲线获得各组分的浓度。

2 结果

2.1 水解条件的选择

尿液中CPs包括游离态及结合态两种,本实验采用盐酸将结合态的CPs水解为游离态,据文献报道^[6,13],选择60℃、100℃水浴1 h和直接加盐酸未经水浴3种条件。结果显示,水浴加热后实际尿样的空白值较高,故本实验选择直接加入盐酸而未经水浴加热酸解尿样。

2.2 内标物的选择

本实验选择PCP同位素标记物(PCP-¹³C₆)及2,4,6-TBP作为内标物。结果显示,在选定的色谱条件下,PCP-¹³C₆与PCP的色谱峰分离不开,而2,4,6-TBP与目标物的化学结构与理化性质相似,与目标物的色谱峰能完全分离,故选用2,4,6-TBP作为内标物。

2.3 提取溶剂的选择

本实验选取正己烷、二氯甲烷两种常用溶剂,比较标准浓度为5 μg/L添加水平时的回收率。结果表明,

当使用二氯甲烷提取时,有机相处于下层,不利于有机层的提取,且正己烷的萃取效率相对较高。

2.4 衍生化条件的选择

由于CPs极性较强,直接进样色谱峰峰形较差。通常选用重氮甲烷、五氟苄基溴、乙酸酐等进行衍生化处理后进样。其中,重氮甲烷须现配现用,且本身具有致癌性;采用五氟苄基溴进行衍生化,耗时长且产物需要过柱净化;而乙酸酐价廉易得,且操作简单、本底值低,衍生化效果好,因此被广泛应用。故本实验选择乙酸酐作为衍生化试剂。

不同的衍生化温度与不同的衍生化时间可对衍生率产生影响^[14]。本实验向空白人工模拟尿中添加5 μg/L的混合标准溶液,按1.5前处理步骤比较30、60℃不同衍生化温度及15、30、60 min不同衍生化时间条件下的加标回收率。实验表明,60℃ 30 min为最佳分析条件。见图1。

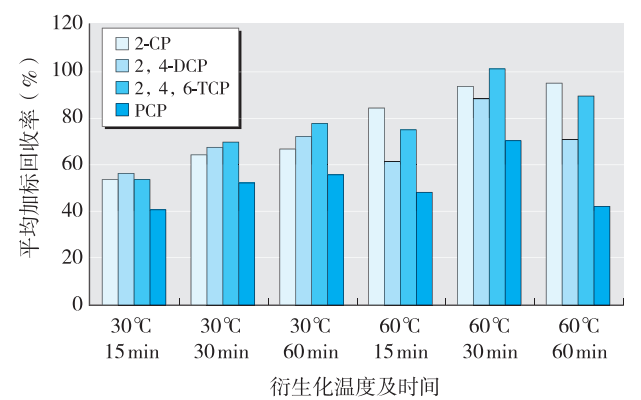


图1 不同衍生化温度及时间对目标物回收率的影响

2.5 质谱条件的选择

按上述色谱条件进行分析(1.2.1),4种CPs及内标物的分离效果较好。利用仪器工作站实验优化助手软件,每隔5 eV在5~60 eV之间进行优化碰撞能量,保留时间、定性及定量离子和碰撞能量,见表1。各组分所对应的衍生化产物的分离情况见图2。

表1 四种CPs衍生化产物的质谱参数

目标物	母离子(m/z)	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)	保留时间(min)	碰撞能量(eV)
2-CP	127.8	63.0	93.0	8.469	25
2,4-DCP	161.8	63.0	98.0	9.597	35
2,4,6-TCP	195.8	97.0	132.0	10.267	35
PCP	265.7	166.8	201.8	12.508	35
2,4,6-TBP(内标物)	329.7	140.9	221.9	12.049	35

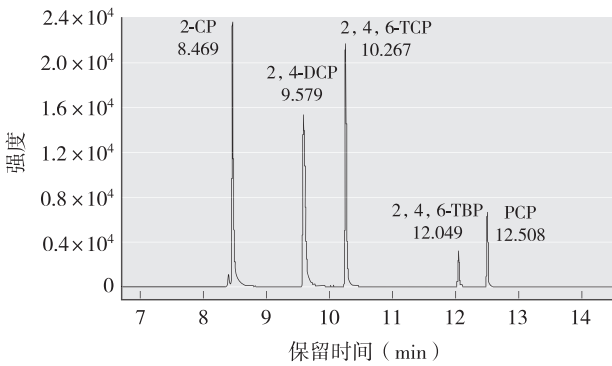


图2 目标物与内标物的多反应监测色谱图

2.6 线性范围、回归方程与检出限

用1.3配制的标准系列进行分析,绘制标准曲线,4种CPs的线性相关系数均大于0.999。以3倍信噪比估算检出限(LOD),检出限为0.1~0.3 μg/L。以10倍信噪比作为定量限,即线性范围的最低点。见表2。

表2 回归方程、线性系数及方法检出限

目标物	线性范围(μg/L)	回归方程	相关系数(r)	检出限(μg/L)
2-CP	0.50~100.0	$\hat{y}=0.1100x+0.0191$	0.9995	0.1
2,4-DCP	0.50~100.0	$\hat{y}=0.1286x-0.0418$	0.9998	0.1
2,4,6-TCP	0.50~100.0	$\hat{y}=0.0997x-0.0470$	0.9997	0.1
PCP	1.0~100.0	$\hat{y}=0.0253x-0.0169$	0.9997	0.3

2.7 方法的准确度和精密度

实验用加标回收率来考察准确度,以相对标准偏差(RSD)来表示精密度。取正常人群混合尿样进行高、中、低(1.0、5.0、50.0 μg/L)3个浓度加标,每个浓度平行测定6次。表3可见,方法的回收率为88.8%~118.2%,RSD为1.3%~5.5%。

表3 方法回收率及精密度结果(n=6)

目标物	本底值(μg/L)	加标值(μg/L)	测得平均值(μg/L)	平均回收率(%)	RSD(%)
2-CP	ND	1.0	0.957	95.7	5.5
		5.0	4.438	88.8	2.2
		50.0	48.673	97.3	1.7
2,4-DCP	ND	1.0	0.978	97.8	3.2
		5.0	5.091	101.8	2.0
		50.0	51.285	102.6	1.4
2,4,6-TCP	ND	1.0	0.982	98.2	5.0
		5.0	5.912	118.2	2.8
		50.0	55.125	110.2	1.3
PCP	ND	1.0	1.038	103.8	5.4
		5.0	5.636	112.7	2.3
		50.0	49.306	98.6	1.8

[注]ND为未检出。

2.8 实际尿样的测定

采用本方法测定50例长期生活在原血吸虫疫区的成年人晨尿中CPs的含量。结果显示,2,4-DCP及2,4,6-TCP均被检出,其他均未被检出(<LOD)。2,4-DCP、2,4,6-TCP的检出范围分别为0.56~0.73 µg/L, 0.66~1.40 µg/L。

3 讨论

本实验研究了人体尿样中多种CPs的GC-MS/MS检测方法。通过选择酸解条件、水浴温度及时间等条件确定方法的最佳测定条件,采用内标法定量。结果显示,该法的准确度和精密度均令人满意,操作简便,灵敏度高,适用于实际尿样的检测。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Ye X, Kuklennyk Z, Needham LL, et al. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2, 5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(4): 638-644.
- [2] Chen XJ, Chen MJ, Xu B, et al. Parental phenols exposure and spontaneous abortion in Chinese population residing in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Chemosphere*, 2013, 93(2): 217-222.
- [3] Aprea C, Colosio C, Mammone T, et al. Biological monitoring of pesticide exposure: a review of analytical methods[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 769(2): 191-219.
- [4] Barr DB, Needham LL. Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 778(1/2): 5-29.
- [5] Veningerová M, Prachar V, Uhnák J, et al. Determination of chlorinated phenols and cresols in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography[J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1994, 657(1): 103-110.
- [6] Crespín MA, Gallego M, Valcarcel M. Solid-phase extraction method for the determination of free and conjugated phenol compounds in human urine[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002, 773(2): 89-96.
- [7] Ito R, Kawaguchi M, Honda H, et al. Hollow-fiber-supported liquid phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in human urine samples[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 872(1/2): 63-67.
- [8] Lee MR, Yeh YC, Hsiang WS, et al. Application of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of chlorophenols in urine[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1998, 707(1/2): 91-97.
- [9] Bravo R, Caltabiano LM, Fernandez C, et al. Quantification of phenolic metabolites of environmental chemicals in human urine using gas chromatography-tandem mass spectrometry and isotope dilution quantification[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 820(2): 229-236.
- [10] Guo F, Liu Q, Shi JB, et al. Direct analysis of eight chlorophenols in urine by large volume injection online turbulent flow solid-phase extraction liquid chromatography with multiple wavelength ultraviolet detection[J]. *Talanta*, 2014, 119: 396-400.
- [11] Chen M, Zhu P, Xu B, et al. Determination of nine environmental phenols in urine by ultra-high-performance liquid chromatography—tandem mass spectrometry[J]. *J Anal Toxicol*, 2012, 36(9): 608-615.
- [12] 许凯声, 陈小华, 陈红兵, 等. 人工尿液质控物的配制与应用[J]. *检验医学*, 2004, 19(4): 361-363.
- [13] Mardones C, Ríos A, Valcárcel M. Determination of chlorophenols in human urine based on the integration of on-line automated clean-up and preconcentration unit with micellar electrokinetic chromatography[J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(14): 2922-2929.
- [14] 陈祥国, 姜兆林, 王淑真, 等. 尿中五氯酚和2,4-二氯-6-硝基苯酚气相色谱分析[J]. *中国法医学杂志*, 2011, 26(3): 213-215.

(收稿日期: 2015-04-13)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 葛宏妍)