

使用LC-MS/MS方法对中国六个特大城市人类尿液样本中的卤乙酸进行测定

Measurement of haloacetic acids in human urine samples from six megacities of China by LC-MS/MS

万延建¹, 赵刘清², 杨总², 刘冰洁², 郭立海²

Wan Yanjian¹, Zhao Liuqing², Yang Zong², Liu Bingjie², Guo Lihai²

¹ Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan

² SCIEX Asia Pacific Application Support Center, Shanghai, China

Key word: TCAA, DCAA, Urine, Excretion rate, In-source fragmentation

引言

在水处理的氯化过程中氯化剂通过与水中的天然有机物反应产生消毒副产物 (DBPs)。卤乙酸 (HAAs) 是最常见的DBPs之一。有5种HAAs包括一氯乙酸 (MCAA)、二氯乙酸 (DCAA)、三氯乙酸 (TCAA)、一溴乙酸 (MBAA) 和二溴乙酸 (DBAA), 受美国环境保护署 (USEPA) 监管。中国定期监测饮用水中的TCAA和DCAA, 并将其参考限值分别设定为100和50 $\mu\text{g/L}$ (GB 5749-2022), 部分原因是它们在五种HAAs中浓度相对较高。

尿TCAA已被证实是饮用经过氯化处理的自来水的生物标志物, 现有的人体研究表明, TCAA在体内代谢不良, 主要以尿液形式排出, 半衰期约为2-4天。大约75%被吸收的TCAA会以母体形式通过尿液排出体外。然而, DCAA、MBAA和DBAA的浓度通常被报道为低于检测限LOD, 因为它们代谢迅速或暴露剂量低。TCAA和DCAA已被确定可能对人类致癌。

此前, 一些研究使用电子捕获检测器检测尿液HAAs, 特异性较差, 无法区分靶峰和干扰。固相萃取和液液萃取已被用于样品预处理, 使用相对较大的样品体积 (可达10 mL) 或大量同位素标记的内标 (每个样品100-500 ng) 进行TCAA检测, 这些因素在一定程度上阻碍了先前HAA检测方法在生物监测中的应用。为了解决这些问题, 本研究建立了一种相对省力、灵敏的尿TCAA和DCAA检测方法。利用这种改进的方法, 我们测定了中国普通人群尿液样本

中的HAAs浓度, 并进一步评估了地区、季节、城市/农村地区和人口特征对其浓度的影响。最后, 根据其尿液浓度计算HAAs的估计每日摄入量 (EDI)。

实验方法

1.1 样品前处理

晨尿尿样采集于50 mL聚丙烯 (PP) 管中, 用干冰运输至指定实验室, 保存于 -80°C , 待分析。在每个尿液样本的等分液 (0.1 mL) 中加入2 ng每种同位素标记的内标。然后将样品用甲酸水 (v/v, 5/10,000) 稀释至0.5 mL, 涡旋, 11000 g离心30分钟。过滤后的样品转移到琥珀色LC小瓶中, 在 -20°C 保存直到分析。

1.2 液相色谱条件

色谱柱: CSH Fluoro-Pheny (150 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)

流动相: A为0.1%甲酸水; B为乙腈

流速: 0.3 mL/min

运行时间: 14.1分钟

梯度条件: 见表1

1.3 质谱条件

采集方式: MRM

扫描模式: 详细质谱条件见表2, MRM离子对见表3

表1. 液相梯度洗脱程序

Time (min)	A %	B %
0	95	5
0.5	95	5
1.0	60	40
8.0	35	65
8.5	5	95
11.5	5	95
11.6	95	5
14.1	95	5

表2. 质谱条件

质谱条件	参数
电喷雾电离 (ESI)	负模式
气帘气CUR (psi)	35
碰撞气CAD (psi)	Medium
喷雾电压IS (V)	-4500
温度TEM (°C)	450

表3. MRM参数

Analytes	Q1	Q3	DP(V)	CE(V)	RT (min)
TCAA 1	116.85	34.95	-35	-18	8.73
TCAA 2	118.85	36.95	-35	-18	8.73
DCAA 1	82.95	34.95	-50	-17	7.54
DCAA 2	84.95	36.95	-50	-17	7.54
TCAA-13C2	117.90	34.97	40	-19	8.73
DCAA-d1	83.95	34.95	50	-17	7.54

1.4 数据统计分析

TCAA的EDI (估计每日摄入量), 计算公式如下: $EDI = C \times V / F \times BW$, 其中C为经SG (比重) 调整后的尿样TCAA浓度; F为尿中TCAA的排泄分数; 根据国际放射防护委员会的数据, V是人体每日尿排泄量 (升/天), 估计男性约为1.6升/天, 女性约为1.2升/天; 根据中国国家卫生健康委员的数据, BW是成年人 (≥ 20 岁) 的体重, 估计男性和女性分别约为69.6和59.0 kg。计算的TCAA EDI与慢性参考剂量 (cRfD) 0.02 mg/kg-bw/day进行比较。

由于这些因素可能导致暴露源的变化, 环境污染物往往表现出区域、城市/农村、人口和季节差。因此, 我们试图研究这些因素是否会影响HAA暴露水平。考虑到TCAA浓度的非正态分布, 25、50和75百分位数被用来描述未调整和SG调整的尿TCAA浓度。使用Kruskal-Wallis检验来探讨城市和城市/农村地区在寒冷和温暖季节的差异。采用线性混合效应模型检验不同人口亚组间尿TCAA浓度的显著差异。模型采用限定最大似然法拟合, 采用固定效应 (年龄、性别、BMI) 和随机效应 (城市、城乡、季节) 进行拟合。采用SAS软件 (9.4版) 进行统计分析。在这些模型中, 经SG调整后的TCAA浓度采用自然对数 (ln) 变换, 以近似方差齐性和残差正态分布。

2 实验结果

2.1 测定结果

为了尽量减少尿液稀释对化学物质浓度的影响, 使用尿SG来调整HAA浓度。 $CSG = C * [(SG_{median} - 1)/(SG - 1)]$, 其中C为测定浓度, SG_{median} 为所有尿样的SG值中位数, SG为每个尿样的比重。配置浓度为0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.0、20.0、50.0 ng/mL的校准曲线, 线性相关系数 $R^2 \geq 0.999$ 。DCAA和TCAA的平均回收率分别为94.4%和96.5%。采用10倍信噪比法测定TCAA和DCAA的仪器定量限 (LOQ) 分别为0.10和0.05 $\mu\text{g/L}$, 考虑稀释系数和LOQ, 相应的方法检出限分别为0.50和0.25 $\mu\text{g/L}$ 。

采用源内裂解碎片作为前体离子进行多反应监测 (MRM), DCAA具有较好的信噪比 (图1a); 在MRM中使用常规前体离子, 可以观察到DCAA的严重干扰 (图1b); 采用源内裂解碎片作为MRM的前体离子, 可以观察到TCAA对噪声的良好信号 (图1c); 在MRM中使用常规前体离子, 可以观察到对TCAA的严重干扰 (图1d)。日间精度 (n=6) 和日内精度 (n=6) 分别在8.3%和7.6%以内。

2.2 不同城市来源尿液种TCAA含量比较

6个城市经SG调整后的TCAA中位数浓度由高到低依次为: 暖季 13.3 $\mu\text{g/L}$ (武汉) > 10.3 $\mu\text{g/L}$ (大连) > 4.24 $\mu\text{g/L}$ (上海) > 3.15 $\mu\text{g/L}$ (兰州) > 2.51 $\mu\text{g/L}$ (成都) > 0.92 $\mu\text{g/L}$ (太原), 寒季 9.62 $\mu\text{g/L}$ (武汉) > 8.95 $\mu\text{g/L}$ (大连) > 7.15 $\mu\text{g/L}$ (上海) > 2.40 $\mu\text{g/L}$ (成都) > 1.87 $\mu\text{g/L}$ (兰州) > 1.01 $\mu\text{g/L}$ (太原)。不同城市间TCAA浓度差异显著 ($p < 0.0001$)。武汉 (长江流域) TCAA浓度分析明显高于其他大部分城市。相比之下, 太原 (黄河流域) 居民的尿TCAA浓度明显低于其他大多数城市。总体而言, 长江流域TCAA浓度显著高于黄河流域 ($p < 0.0001$)。无论季节如何, 大连 (辽河流域) 与武汉的浓度差异不显著, 辽河流域与长江流域的差异也不显著。在长江流域内, 无论是暖季还是寒季, 成都的TCAA浓度都低于上海和武汉。

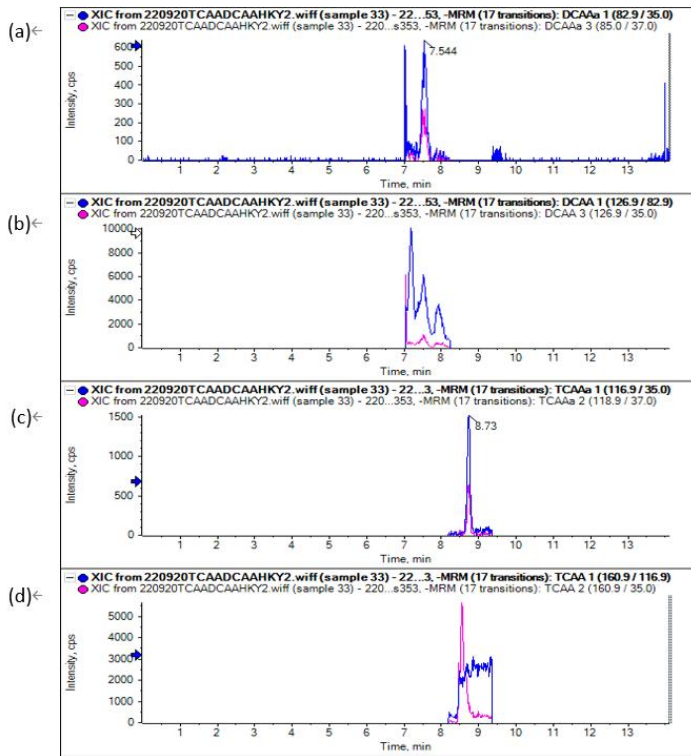


图1. 尿液样本中二氯乙酸 (DCAA) 和三氯乙酸 (TCAA) 的代表性色谱图:(a)DCAA源内裂解碎片做母离子;(b) DCAA常规离子;(c) TCAA源内裂解碎片做母离子;(d)TCAA常规离子

2.3 城乡来源尿液中TCAA含量比较

图2显示了城乡居民尿液TCAA浓度的显著差异。在暖季和冬季，6个城市居民的TCAA浓度都是农村居民的7-13倍。图3显示，温暖季节6个城市参与者尿液TCAA浓度 (SG调整后中位数浓度:10.3 μg/L) 显著高于寒冷季节参与者 (8.55 μg/L) (p < 0.01)。特别是在武汉观察到显著的差异 (p < 0.0001)。相比之下，上海地区在寒冷季节尿液TCAA浓度明显较高。

2.4 其他因素

表4显示，教育水平、城乡、流域和城市与TCAA浓度显著相关 (p < 0.05)，而其他选定的人口统计学特征，如年龄、性别和BMI，与TCAA浓度无关。然而，教育水平与城市/农村地区相关 (r = 0.5; p < 0.0001)，城市/农村地区对TCAA浓度的影响较大；流域与城市相关 (r = 0.82; p < 0.0001)，城市的影响更大。因此，在随后的多变量分析中没有考虑教育程度和河流流域 (表5)。

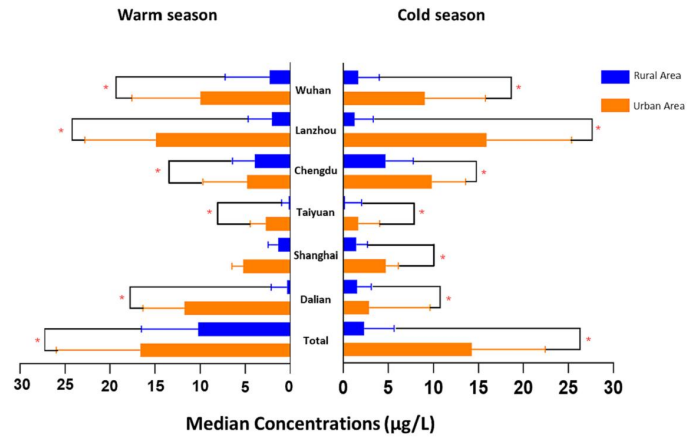


图2. 六市城乡成人不同季节尿TCAA浓度比较分析采用Wilcoxon秩和检验;*p < 0.05。

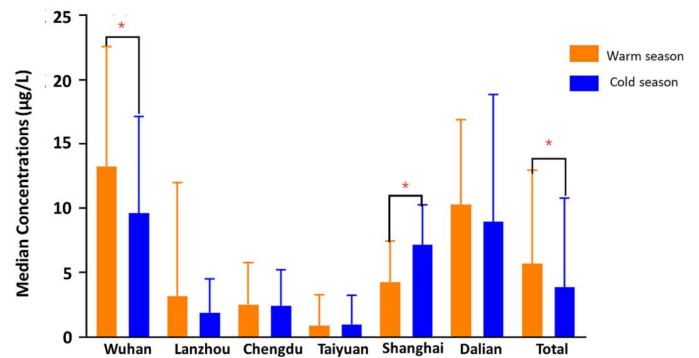


图3. 不同季节成人TCAA浓度中位数。由于不同季节重复采样，采用线性混合效应模型进行分析;*p < 0.05。

表5显示了基于多变量模型的与TCAA暴露水平相关的因素，包括城市、季节、地区、年龄、性别和BMI。结果显示，城市、季节和城乡地区对尿TCAA浓度有显著影响 (p < 0.05)。

2.5 根据其尿液浓度计算HAAs的估计每日摄入量(EDI)

表6显示了六个城市在两个季节中男性和女性的TCAA EDI。男性和女性之间的EDI没有差异。武汉受试者在暖季TCAA的EDI最高 (男性1.16 μg/ kg-bw/day, 女性1.11 μg/ kg-bw/day, 对应于第95个百分点)，但仍远低于cRfD的0.02 mg/kg-bw/day，表明TCAA的EDI对一般中国成年人来说是相对安全的。然而，幼儿和儿童的暴露评估需要进一步调查。

表4. 人口统计学特征对三氯乙酸(TCAA)浓度的影响

	Estimate*	t value	p
Age /years			
>60	Reference	-	-
46-60	0.07	0.52	0.60
20-45	0.09	0.63	0.53
Sex			
Female	Reference	-	-
Male	-0.11	-0.94	0.35
BMI /kg/m²			
Overweight (24)	Reference	-	-
Normal (18.5BMI<24)	0.03	0.25	0.81
Underweight (<18.5)	0.007	0.02	0.98
Education			
>high school	Reference	-	-
high school	-0.45	-2.65	0.01
<high school	-0.87	-6.34	<0.0001
Urban-rural area			
Rural	Reference	-	-
Urban	1.18	11.4	<0.0001
River Basin			
Yangtze River Basin	Reference	-	-
Yellow River Basin	-0.89	-8.65	<0.0001
Liao River Basin	0.03	0.18	0.85
City			
Central China (Wuhan)	Reference	-	-
Northwest China (Lanzhou)	-0.91	-6.98	<0.0001
Southwest China (Chengdu)	-1.23	-9.48	<0.0001
North China (Taiyuan)	-1.76	-12.90	<0.0001
East China (Shanghai)	-0.56	-4.05	<0.0001
Northeast China (Dalian)	-0.40	-2.91	0.0037

* 采用线性混合效应模型(LMM)进行分析。

表5. 独立预测变量的多变量分析

Independent variables	Estimate*	t	p
City			
Central China (Wuhan)	0.60	4.19	<0.0001
Northwest China (Lanzhou)	-0.36	-2.23	0.03
Southwest China (Chengdu)	-0.72	-4.23	<0.0001
North China (Taiyuan)	-1.21	-7.62	<0.0001
East China (Shanghai)	-0.05	-0.31	0.76
Northeast China (Dalian)	Reference	-	-
Season			
Warm	0.20	3.56	0.0004
cold	Reference	-	-
Urban-rural			
Urban	1.15	13.51	<0.0001
rural	Reference	-	-
Age (continuous)	0.0003	0.09	0.93
Sex			
male	-0.16	-1.9	0.06
female	Reference	-	-
BMI (continuous)	-0.004	-0.27	0.79

* 采用线性混合效应模型(LMM)进行分析。

表6. TCAA每日摄入量(EDI; $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}/\text{day}$)

	Ordinary exposure scenario		High exposure scenario	
	Male	Female	Male	Female
Warm season				
Total	0.19	0.15	0.89	0.87
Central China(Wuhan)	0.36	0.40	1.16	1.11
Northwest China(Lanzhou)	0.17	0.09	0.87	0.48
Southwest China(Chengdu)	0.09	0.08	0.25	0.24
North China(Taiyuan)	0.03	0.04	0.39	0.48
East China(Shanghai)	0.13	0.11	0.33	0.48
Northeast China (Dalian)	0.31	0.29	0.67	1.08
Cold season				
Total	0.09	0.12	0.91	0.73
Central China(Wuhan)	0.27	0.31	1.11	0.71
Northwest China(Lanzhou)	0.07	0.08	0.32	0.67
Southwest China(Chengdu)	0.05	0.07	0.20	0.33
North China(Taiyuan)	0.03	0.04	0.44	0.28
East China (Shanghai)	0.16	0.21	0.56	0.77
Northeast China(Dalian)	0.27	0.25	1.00	0.75

3 总结

本研究建立了一种简单、灵敏度高的尿TCAA和DCAA检测方法。提示尿TCAA在中国人群中的检出率是高，但在不同地区有所不同。然而，DCAA很少被检测到。较高的TCAA浓度更有可能出现在中国中部、城市地区和暖季。在大多数城市，温暖季节通常有较高的TCAA浓度；而对于沿海城市上海，海水入侵可能导致冷季TCAA浓度升高。

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-32056-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)