

HPLC/MSⁿ法鉴定环境激素邻苯二甲酸丁基苄酯在小鼠尿中的代谢产物

李文兰¹, 季宇彬¹, 张大雷², 范玉奇¹

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究发展中心, 哈尔滨 150076; 2. 黑龙江省公安厅, 哈尔滨 150008)

摘要:应用 HPLC-MSⁿ 方法, 研究了邻苯二甲酸丁基苄酯在小鼠尿液中的代谢产物, 并对尿中推测的代谢物 and 标准品分别进行 HPLC-UV 和二级全扫描质谱 (MS²) 分析, 结果在尿中发现了 6 个代谢产物, 分别为邻苯二甲酸、马尿酸、邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯、邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物及邻苯二甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物。推断环境激素邻苯二甲酸丁基苄酯在小鼠体内的代谢途径为原形首先水解生成邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯、邻苯二甲酸, 部分邻苯二甲酸发生脱羧反应生成苯甲酸, 苯甲酸再与内源性物质甘氨酸结合成马尿酸, 邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯和内源性 β -D-葡萄糖醛酸结合, 生成水溶性较大的邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物和邻苯二甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物。

关键词:环境激素; 邻苯二甲酸丁基苄酯; 液相色谱/质谱法; 代谢产物

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)03-0627-06

Identification of Metabolites of Environmental Hormone Butylbenzyl Phthalate in Mice Urine by Liquid Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry

LI Wen-lan¹, JI Yu-bin¹, ZHANG Da-lei², FAN Yu-qi¹

(1. Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Public Security of Heilongjiang Province, Harbin 150008, China)

Abstract: The metabolites of butylbenzyl phthalate in mice urine were identified by HPLC-MSⁿ. After the analysis of speculated metabolites and standard sample by HPLC-UV and the second full mass scanning (MS²), we find six metabolites: phthalic acid, benzoyl glycocholic acid, monobutyl phthalate, benzyl phthalate, glucuronyl-monobutyl phthalate, glucuronyl-benzyl phthalate. We deduced metabolic approach of butyl benzyl phthalate *in vivo* was that butyl benzyl phthalate hydrolyzed into the phthalic acid, monobutyl phthalate and benzyl phthalate. Partial phthalic acid became into benzoic acid by decarboxylizing. Then benzoic acid conjugated endogenous glycine and benzoyl glycocholic acid was produced. Monobutyl phthalate and benzyl phthalate conjugated endogenous β -D-glucuronic acid and produced the glucuronyl-monobutyl phthalate and glucuronyl-benzyl phthalate.

Key words: environmental hormone; butylbenzyl phthalate; HPLC/MS; metabolites

近年来的研究表明, 一些天然物质和人工合成化学物质能干扰生物体内分泌系统的正常机能, 从而影响生物体的健康, 导致人类和野生动物的生殖系统障碍与疾病^[1-2]. 这些化学物质称为内分泌干扰物质或称“环境激素”, 并被称为第三代环境污染物^[3,4].

邻苯二甲酸丁基苄酯 (butylbenzyl phthalate, BBP) 主要用于塑料 (尤其是聚氯乙烯塑料)、汽车、润滑剂、粘合剂、化妆品 (如头发定型剂)、服装、农药等行业, 属于环境激素之一^[5-6]. 研究报道 BBP 具有明显的生殖毒性、致畸性和胚胎毒性, 可引发血清中睾酮减少、促卵激素的增加及子宫增大, 降低卵巢重量, 并改变性别分化^[7-15]. 由于该化合物的脂/水分配系数高、难以降解并普遍存在于城市污泥及大气中^[16-18], 使人类每天摄入量达 4.7 mg/kg^[19], 对人群健康和生命安全造成很大威胁, 已被美国 EPA 列为

优先控制污染物. 目前, 有关邻苯二甲酸丁基苄酯的环境安全性已成为当前世界各国关注的重大问题之一.

国外采用 GC-MS 技术对大鼠尿中代谢产物进行了研究, 从中鉴定出马尿酸、邻苯二甲酸单丁酯 (MBuP)、邻苯二甲酸苄酯 (MBeP)、邻苯二甲酸代谢产物^[20]. 笔者在前期工作中研究了 BBP 的肝内代谢, 鉴定出邻苯二甲酸单丁酯及邻苯二甲酸甲丁酯 2 种代谢产物^[21]. 为进一步阐明该化合物在动物体内的代谢过程, 采用 HPLC-MSⁿ 方法, 利用离子阱技术在温和的条件下直接获得待测物的准分子离子峰, 并对选定的母离子逐步提高其相对碰撞能量, 给

收稿日期: 2006-04-26; 修订日期: 2006-06-05

基金项目: 黑龙江省博士后基金项目

作者简介: 李文兰 (1967 ~), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境科学与工程, E-mail: lwdldz@163.com

出母离子与碎片离子的关系,为代谢产物的结构分析提供丰富的信息.本研究通过对染毒后小鼠尿样进行的直接定性分析,发现了6种代谢产物,揭示出环境激素邻苯二甲酸丁基苄酯在机体中的代谢途径和代谢机制,以期环境中出现的不明化合物提供来源和科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

邻苯二甲酸丁基苄酯(无锡市有机化工厂,纯度为98%);马脲酸对照品(Beker公司);邻苯二甲酸对照品、邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯对照品(由北京航空航天大学环境工程系提供);Agilent 1100液相色谱系统(包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、DAD检测器);Agilent 1100液相色谱/VL型离子阱液质联用仪(配有电喷雾源ESI及大气压化学电离源APCI);仪器操作及数据处理系统采用HPLC-3D化学工作站.

1.2 实验方法

1.2.1 尿液样品的制备

将小鼠禁食12 h,经口染毒BBP后放入自制的小鼠代谢笼内,只允许其饮水,收集每只小鼠的24 h尿液.将尿液酸化后($\text{pH}=3$)与乙酸乙酯混合萃取,取乙酸乙酯层,室温下挥干,用5 mL甲醇冲洗残渣,取1 mL甲醇冲洗液用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤(随行作空白尿液对照),采用液相色谱-质谱联用仪进行分析测定.

1.2.2 HPLC-MSⁿ分析条件

色谱柱:ZORBAX SBC-C₁₈色谱柱(150 mm×2.1 mm,5 μm);采用梯度洗脱方式,流动相:0.2%冰醋酸水溶液:甲醇,时间0~30 min,甲醇浓度10%~80%;流速:0.2 mL·min⁻¹;检测波长:254 nm;进样量:2 μL ;柱温:30℃;质谱仪所用离子源为大气压电喷雾电离源(ESI);雾化器压力:276 kPa(40psi);干燥气(N₂)温度:325℃;干燥气流速:8.00 L·min⁻¹.选择负离子扫描方式,再利用离子阱对准分子离子峰及选定的碎片离子进行二级质谱(MS²)分析,得到相应的色谱图和质谱图.

2 结果与讨论

2.1 I相代谢产物的LC-MSⁿ分析

根据毒物代谢的规律和特点^[22],化学毒物在体内经过氧化、还原、水解等反应,生成极性较大的I相代谢产物.BBP是双酯类化合物,非常容易水解,

推测BBP的水解产物可能是其主要的代谢产物.通过比较染毒和未染毒小鼠尿液样品的HPLC-UV及HPLC-MS总离子流色谱图(图1~3),确定了6种代谢产物,分别是色谱峰1~6,各代谢物结构相关的分子离子及各级碎片离子质谱数据如表1.分析各自的二级碎片离子谱鉴定各代谢产物,结合BBP化合物的结构特点,推测化合物2、5、6是BBP在小鼠体内的I相代谢产物.

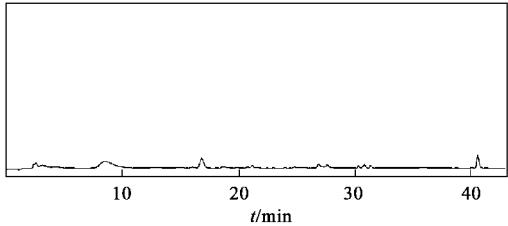


图1 未染毒BBP小鼠的尿液HPLC-UV色谱图
Fig.1 HPLC-UV chromatogram of blank mice urine

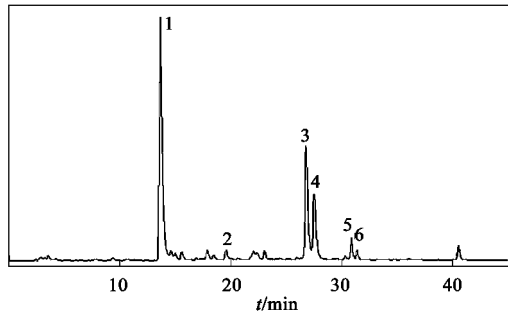


图2 染毒BBP小鼠的尿液HPLC-UV色谱图
Fig.2 HPLC-UV chromatogram of mice urine after oral administration of BBP

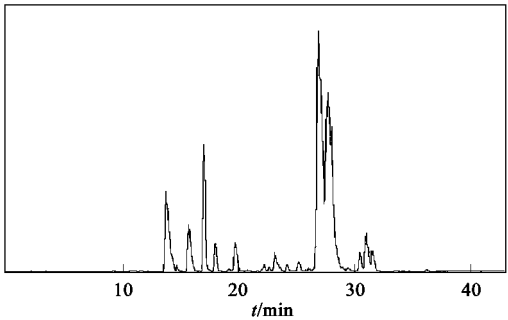


图3 染毒BBP小鼠的尿液代谢LC-MS总离子流图
Fig.3 Total ion chromatogram of mice urine after oral administration of BBP by LC/MS

代谢产物2的准分子离子峰 m/z 165,提示相应的分子量为166,二级碎片峰 m/z 121比 m/z 165

表 1 负离子模式 ESI 源下检测到的代谢产物质谱数据

Table 1 Mass spectra data of metabolites in ESI source of negative ion mode

色谱峰代号	保留时间/min	准分子离子峰	二级碎片特征离子峰
1	9.487	178(M-1)	134
2	13.796	165(M-1)	121
3	24.150	397(M-1)	221, 175
4	25.032	431(M-1)	387, 255
5	28.823	221(M-1)	177, 147, 121
6	29.426	255(M-1)	211, 147, 107, 121

少 44, 提示在原有的结构脱去羧基(—COO), 结合 BBP 的原形结构, 推断该化合物可能是邻苯二甲酸. 质谱图见图 4 和图 5. 依照同样的条件, 对邻苯二甲酸对照品进行 HPLC-UV 和 MS² 分析, 结果对照品的保留时间和 MS² 级质谱图与尿样中的 m/z 165 离子完全一致, 确定了代谢产物 1 为邻苯二甲酸.

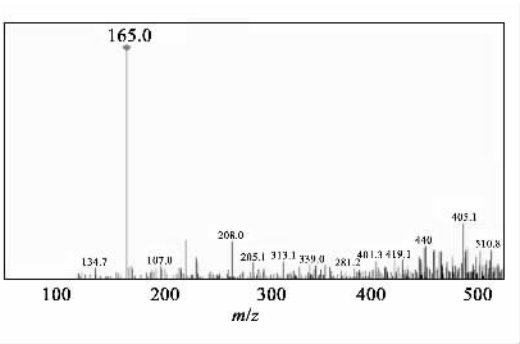


图 4 代谢产物 2 的一级质谱图

Fig.4 Mass spectra of metabolites 2

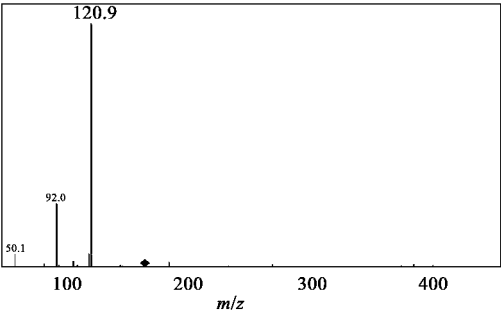


图 5 准分子离子 m/z 165 的 MS-MS 质谱图

Fig.5 Mass-Mass spectra of quasi-molecular ion m/z 165

代谢产物 5 的准分子离子峰 m/z 221, 提示相应的分子量为 222, 二级碎片峰 m/z 177 比 m/z 221 少 44, 提示在原有的结构脱去羧基(—COO), m/z 121 比 m/z 177 少 56, 提示在原有的结构脱去—C₄H₉ 生成苯甲酸, m/z 147 提示结构中的酯链发生断裂, 生成邻苯二甲酸酐部分, 综合上述信息, 推断该化合物为邻苯二甲酸单丁酯. 质谱图见图 6、图 7. 依照同样

的条件, 对合成的邻苯二甲酸单丁酯对照品进行 HPLC-UV 和 MS² 分析, 结果对照品的保留时间和 MS² 级质谱图与尿样中的 m/z 221 离子完全一致, 确定了代谢产物 5 为邻苯二甲酸单丁酯.

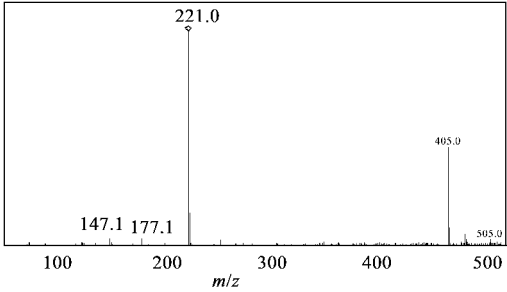


图 6 代谢产物 5 的一级质谱图

Fig.6 Mass spectra of metabolites 5

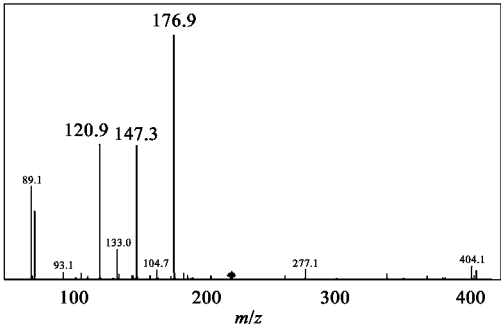


图 7 准分子离子 m/z 221 的 MS-MS 质谱图

Fig.7 Mass-Mass spectra of quasi-molecular ion m/z 221

代谢产物 6 的准分子离子峰 m/z 255, 提示相应的分子量为 256, 二级碎片峰 m/z 211 比 m/z 255 少 44, 提示在原有的结构脱去羧基(—COO), m/z 121 比 m/z 211 少 90, 提示在原有的结构脱去苄基生成苯甲酸, m/z 147 提示结构中的酯链发生断裂, 失去 m/z 107, 生成邻苯二甲酸酐部分, 综合上述信息, 推断该化合物为邻苯二甲酸苄酯. 质谱图见图 8、图 9. 依照同样的条件, 对合成的邻苯二甲酸苄酯对照品进行 HPLC-UV 和 MS² 分析, 结果对照品的保留时间和 MS² 级质谱图与尿样中的 m/z 255 离子完全一致, 确定了代谢产物 6 为邻苯二甲酸苄酯.

2.2 II 相代谢产物的 LC-MSⁿ 分析

根据毒物代谢的规律和特点^[22], 毒物在体内生成的 I 相代谢产物, 可进一步与体内的内源性物质如葡萄糖醛酸、硫酸、甘氨酸、谷胱甘肽等结合, 从而生成 II 相代谢产物, 外源性化合物通过结合反应, 极性将有所增强, 易于体内排泄. 结合 BBP 化合物的结构特点, 在 HPLC-UV 及 HPLC-MS 总离子流色谱

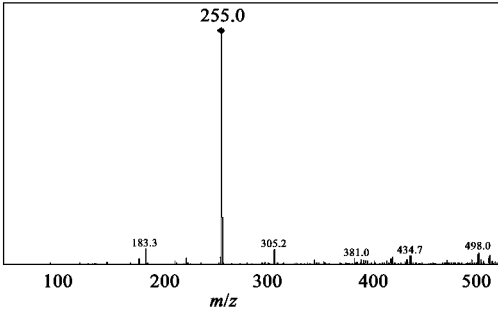


图 8 代谢产物 6 的一级质谱图

Fig.8 Mass spectra of metabolites 6

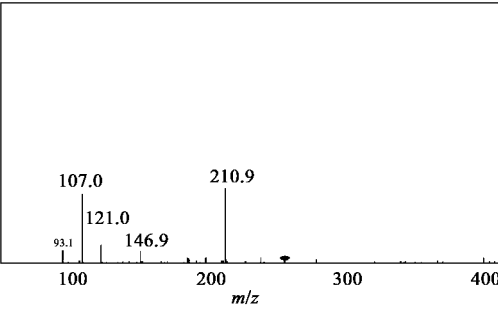


图 9 准分子离子 m/z 255 的 MS-MS 质谱图

Fig.9 Mass-Mass spectra of quasi-molecular ion m/z 255

图确定的 6 个代谢产物中,推测化合物 1、3、4 是 BBP 在小鼠体内的 II 相代谢产物。

代谢产物 1 准分子离子峰 m/z 178,提示相应的分子量为 179,二级碎片峰 m/z 134 比 m/z 178 少 44,提示在原有的结构脱去羧基($-COO$),根据含氮规律,该化合物可能含有氮,结合上述信息,推测该化合物可能是马脲酸。质谱图见图 10、图 11。依照同样的条件,对马脲酸对照品进行 HPLC-UV 和 MS^2 分析,结果对照品的保留时间和 MS^2 级质谱图与尿样中的 m/z 178 离子完全一致,确定了代谢产物 1 为马脲酸。

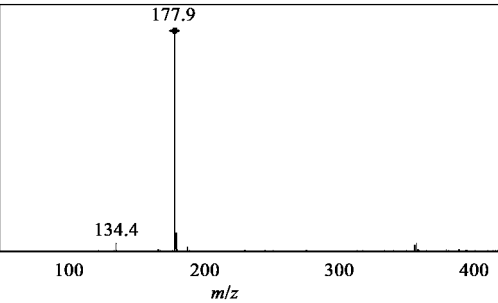


图 10 代谢产物 1 的一级质谱图

Fig.10 Mass spectr of metabolites 1

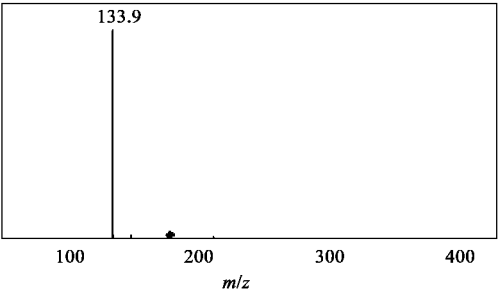


图 11 准分子离子 m/z 177.9 的 MS-MS 质谱图

Fig.11 Mass-Mass spectra of quasi-molecular ion m/z 177.9

代谢产物 3 的准分子离子峰 m/z 397,提示相应的分子量为 398,二级碎片峰 m/z 221 比 m/z 397 少 176,提示在原有的结构脱去葡萄糖醛酸($-C_6H_9O_6$),推断该化合物为邻苯二甲酸单丁酯的葡萄糖醛酸结合物。质谱图见图 12、图 13。

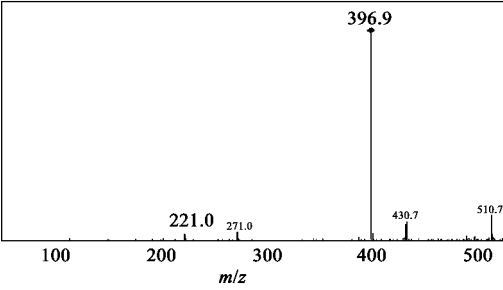


图 12 代谢产物 3 的一级质谱图

Fig.12 Mass spectra of metabolites 3

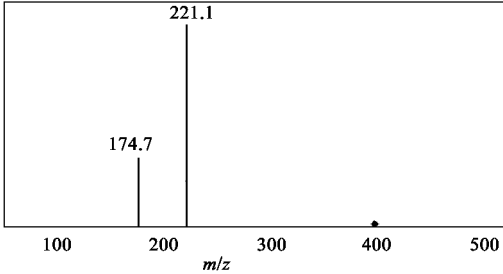


图 13 准分子离子 m/z 396.9 的 MS-MS 质谱图

Fig.13 Mass-Mass spectra of quasi-molecular ion m/z 396.9

代谢产物 4 的准分子离子峰 m/z 431,提示相应的分子量为 432,二级碎片峰 m/z 255 比 m/z 431 少 176,提示在原有的结构脱去葡萄糖醛酸($-C_6H_9O_6$),二级碎片峰 m/z 387 比 m/z 431 少 44,提示在原有的结构脱去羧基($-COO$),综合上述信息,推断该化合物为邻苯二甲酸苄酯的葡萄糖醛酸结合物。质谱图见图 14、图 15。

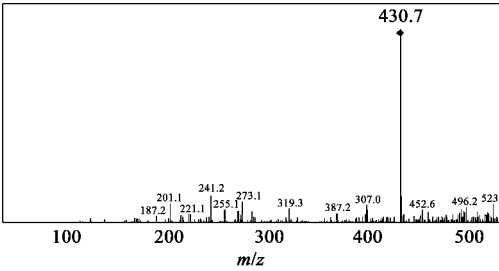


图 14 代谢产物 4 的一级质谱图
Fig. 14 Mass spectra of metabolites 4

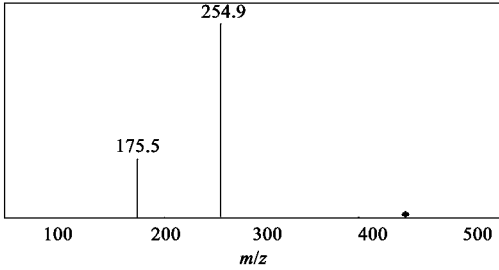


图 15 准分子离子 m/z 430.7 的 MS-MS 质谱图
Fig. 15 Mass-Mass spectra of quasi-molecular ion m/z 430.7

2.3 BBP 在动物体内的代谢途径

综上所述,环境激素邻苯二甲酸丁基苄酯在小鼠体内被代谢成 3 个 I 相代谢产物邻苯二甲酸、邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯和 3 个 II 相结合型代谢产物马尿酸、邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物及邻苯二甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物. 其主要的代谢途径应为: ① 邻苯二甲酸丁基苄酯首先发生水解, 生成邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯, 生成的邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯继续水解成邻苯二甲酸. ② 水解生成的部分邻苯二甲酸发生脱羧反应生成苯甲酸, 苯甲酸继续和体内的内源性成分甘氨酸结合成马尿酸, 邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯和内源性 β -D-葡萄糖醛酸结合, 生成水溶性较大的邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物和邻苯二甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物, 从而利于毒物从体内消除(该过程如图 16 所示). 从 HPLC-UV 色谱图上可以看出, BBP 被代谢的 6 个产物中, 以马尿酸、邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物及邻苯二

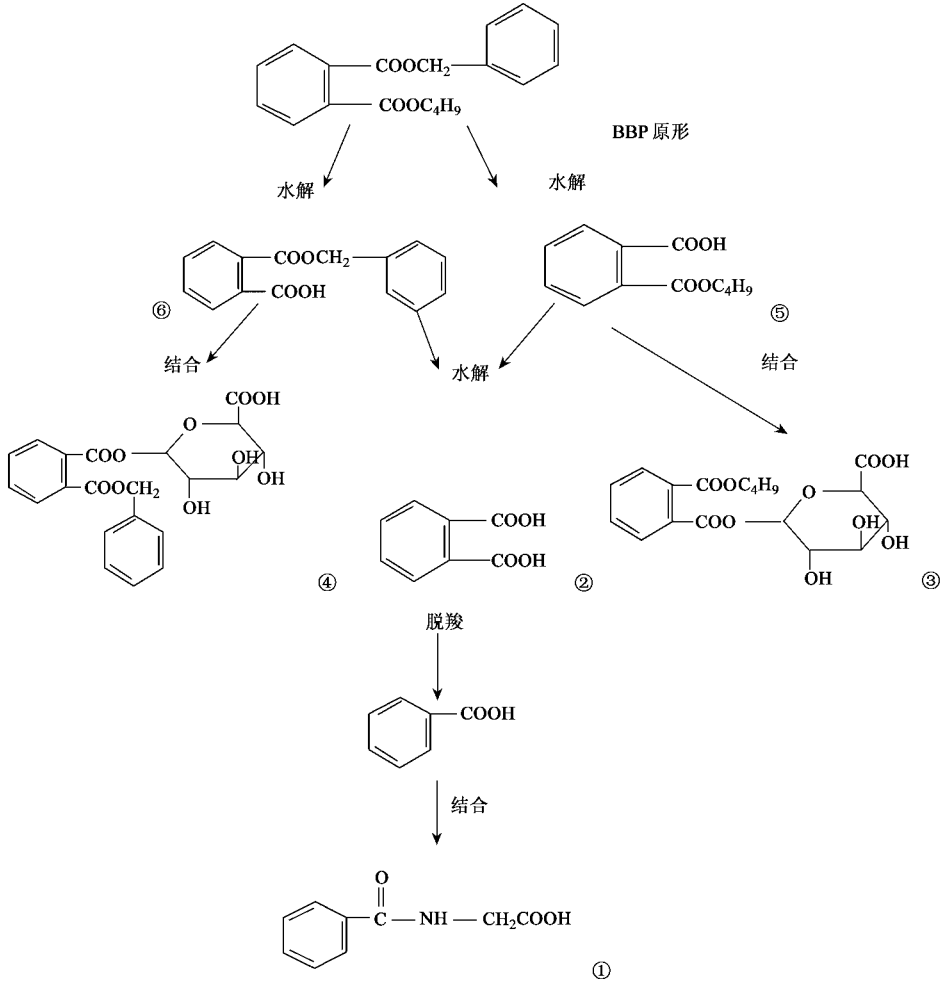


图 16 BBP 在小鼠体内的代谢途径
Fig. 16 Proposed metabolic pathways of BBP in mice

甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物的含量比较高,故认为结合反应是 BBP 在体内代谢的主要途径。

3 结论

(1)邻苯二甲酸丁基苄酯在尿液中没有原形存在,被代谢成邻苯二甲酸、邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯、马尿酸、邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物及邻苯二甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物。

(2)邻苯二甲酸丁基苄酯在体内的主要代谢途径是 BBP 原形首先发生水解,生成邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯,生成的邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯继续水解成邻苯二甲酸,部分邻苯二甲酸发生脱羧反应生成苯甲酸,苯甲酸和体内的内源性成分甘氨酸结合成马尿酸,邻苯二甲酸单丁酯、邻苯二甲酸苄酯和内源性 β -D-葡萄糖醛酸结合,生成水溶性较大的邻苯二甲酸单丁酯葡萄糖醛酸结合物和邻苯二甲酸苄酯葡萄糖醛酸结合物,从而利于毒物从体内消除。

参考文献:

- [1] Crisp T M, Clegg E D, Cooper R L, *et al.* Environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis[J]. Environ. Health Perspect, 1998, **106**(1): 11 ~ 56.
- [2] Jobling S, Sheahan D, Osborne J A, *et al.* Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, **15**: 194 ~ 202.
- [3] Rudel R. Predicting Health effects of exposure to compounds with estrogenic activity: methodological issues [J]. Environ. Health Perspect, 1997, **105**(3): 655 ~ 663.
- [4] Hutchinson T H, Matthiessen P. Endocrine disruption in wildlife: identification and ecological relevance [J]. Science of Total Environment, 1999, **233**: 1 ~ 3.
- [5] Van Wezel A P, Van Vlaardingen, Posthumus R, *et al.* Environmental risk limits for two phthalates with special emphasis on endocrine disruptive properties [J]. Ecotoxico. Environ. Safety, 2000, **46**: 3205 ~ 3214.
- [6] Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, *et al.* NTP Center for the Evaluation of Risk to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butylbenzyl phthalate[J]. Reprod. Toxicol., 2002, **16**: 453 ~ 487.
- [7] 李文兰,季宇彬,杨波,等. 环境中邻苯二甲酸丁基苄酯的雌激素生物活性[J]. 城市环境与城市生态, 2003, **16**(1): 22 ~ 24.
- [8] Tetsuji N, Ryo O, Hideki M, *et al.* Effect of butylbenzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study[J]. Reprod. Toxicol., 2001, **14**(2): 513 ~ 532.
- [9] Gray L E, Ostby J, Furr J, *et al.* Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat[J]. Toxicol. Sci., 2000, **58**(2): 350 ~ 365.
- [10] Piersma A H, Verhoef A, Biesebeek J D, *et al.* Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design[J]. Reprod. Toxicol., 2001, **14**(8): 417 ~ 442.
- [11] 李文兰,季宇彬,杨玉楠,等. 邻苯二甲酸丁基苄酯的生殖毒性及其作用机制[J]. 环境科学, 2004, **25**(1): 7 ~ 13.
- [12] Makoto E, Emiko M. Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butylbenzyl phthalate during late pregnancy[J]. Reproductive Toxicology, 2002, **16**: 71 ~ 76.
- [13] Anne-Marie S, Jean-Philippe S, Frederic G. Comparative embryotoxicities of butylbenzyl phthalate, mono-n-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: *in vivo* and *in vitro* observations[J]. Reproductive Toxicology, 2003, **17**: 575 ~ 583.
- [14] Rochelle W T, Christina B M, Melissa C M, *et al.* Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats [J]. Reproductive Toxicology, 2004, **18**: 241 ~ 264.
- [15] Vickie S W, Christy L, Johnathan F, *et al.* Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced ins 13 gene expression in the fetal rat testis[J]. Toxicology Letters, 2004, **46**: 207 ~ 215.
- [16] Smith S R. Agricultural recycling of sewage and the environment [M]. Wallingford: CAB International, 1996. 207 ~ 236.
- [17] Cantreeds W. Comparision between the organic Fraction of Suspended Matter at a Background and an urban station[J]. Total Environ., 1997, **8**(1): 79 ~ 88.
- [18] 莫测辉,蔡全英,吴启堂,等. 我国城市污泥中邻苯二甲酸酯的研究[J]. 中国环境科学, 2001, **21**(4): 362 ~ 366.
- [19] Tsumura Y, Ishimitsuo S. Eleven Phthalate Esters and Di (2-ethylhexyl) Adipate in One-Week Duplicate Diet Samples Obtained from Hospitals and Their Estimated Daily Intake[J]. Food Addit. Contam., 2001, **18**(5): 449 ~ 460.
- [20] Nativelle K, Picard I, Valentin J C, *et al.* Metabolism of N-Butyl Benzyl Phthalate in the Female wistar Rat[J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, **37**: 905 ~ 917.
- [21] 李文兰,杨玉楠,季宇彬,等. 邻苯二甲酸丁基苄酯在鼠肝匀浆中的生物降解及代谢产物鉴定[J]. 环境科学学报, 2004, **24**(2): 498 ~ 503.
- [22] 张铤. 毒理学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997. 78 ~ 92.