

APPLICATION OF LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY (LC-MS/MS) TO ANALYZE BISPHENOL A CONTENT IN URINE

Nguyen Thi Huyen^{1*}, Ta Thi Binh¹, Pham Thi Van¹, Phung Thi Thao¹, Pham Van Tuan¹, Nguyen Van Tiem¹,
Pham Thi Hoai An¹, Do Thuy Linh¹, Phan Thi Thuy Chinh¹, Vu Mai Anh²

¹National Institute of Occupation and Environmental Health-No. 57, Le Quy Don Street, Hai Ba Trung Ward, Hanoi City, Vietnam

²Hanoi University of Public Health- 1A Duc Thang, Dong Ngac Ward, Hanoi, Vietnam

Received: 02/10/2025

Revised: 03/10/2025; Accepted: 17/11/2025

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is an industrial chemical with major applications in the production of polycarbonate plastics and epoxy resins. Polycarbonate plastics are used for food containers, epoxy resins are used as coatings inside food and beverage cans. Exposure to BPA can cause endocrine disruption, obesity, cardiovascular diseases, and possibly cancer in humans. The aim of this study was to develop a method for the analysis of BPA in urine using a liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS). The urine samples were incubated with β -glucuronidase/arylsulfatase enzyme and acetate buffer at 37°C for 3 hours. The samples were then cleaned up through an Oasis HLB solid-phase extraction column, eluted with methanol. The chromatographic column used was the Kinetex® Phenyl-Hexyl column and analyzed on a Qtrap 3200 LC-MS/MS system. The results showed that the limit of detection (LOD) of the method was 0.066 $\mu\text{g/L}$ and the limit of quantification (LOQ) was 1 $\mu\text{g/L}$. The recovery rate was 92.09% and the relative standard deviation (RSD%) was 3.61%. The BPA analysis method has good sensitivity and high recovery, according to the standards of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). This method was applied to determine BPA concentration in 160 urine samples from people living in Lang Son province, with the geometric mean 1.5 (CI 95%: 1,32 – 1,70) $\mu\text{g/g creatinine}$, the median 1.48 (CI 95%: 1,24 – 1,67) $\mu\text{g/g creatinine}$.

Keywords: Bisphenol A (BPA), (LC-MS/MS), human urine, method.

*Corresponding author

Email: huyena0810@gmail.com Phone: (+84) 977555901 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD21.3824>

ỨNG DỤNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG KHỐI PHỔ (LC-MS/MS) ĐỂ PHÂN TÍCH HÀM LƯỢNG BISPHENOL A TRONG NƯỚC TIỂU

Nguyễn Thị Huyền^{1*}, Tạ Thị Bình¹, Phạm Thị Vân¹, Phùng Thị Thảo¹, Phạm Văn Tuấn¹, Nguyễn Văn Tiềm¹, Phạm Thị Hoài An¹, Đỗ Thùy Linh¹, Phan Thị Thuý Chinh¹, Vũ Mai Anh²

¹Viện Sức khỏe nghề nghiệp và môi trường - Số 57, phố Lê Quý Đôn, phường Hai Bà Trưng, thành phố Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y tế công cộng - 1A Đức Thắng, phường Đông Ngạc, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài: 02/10/2025

Ngày chỉnh sửa: 03/10/2025; Ngày duyệt đăng: 17/11/2025

TÓM TẮT

Bisphenol A (BPA) là một hóa chất công nghiệp có ứng dụng chính trong sản xuất nhựa polycarbonate (PC) và epoxy. Nhựa polycarbonate được sử dụng làm hộp đựng thực phẩm, nhựa epoxy được sử dụng làm lớp phủ bên trong của lon đựng thực phẩm và đồ uống. Phơi nhiễm với BPA có thể gây rối loạn nội tiết, bệnh béo phì, tim mạch và có thể gây ung thư ở người. Mục tiêu của nghiên cứu là nhằm xây dựng phương pháp phân tích BPA trong nước tiểu bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS). Mẫu nước tiểu được ủ với enzyme β -glucuronidase/arylsulfatase và đệm acetat ở 37°C trong 3 giờ. Sau đó mẫu được làm sạch qua cột chiết pha rắn Oasis HLB, rửa giải bằng methanol. Cột sắc ký được sử dụng là cột Kinetex® Phenyl-Hexyl column và phân tích trên hệ thống LC-MS/MS Qtrap 3200. Kết quả cho thấy: Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp là 0,066 $\mu\text{g/L}$, giới hạn định lượng (LOQ) là 1 $\mu\text{g/L}$. Độ thu hồi là 92,09% và độ lệch chuẩn tương đối (RSD%) là 3,61%. Phương pháp phân tích BPA có độ nhạy tốt, độ thu hồi cao đáp ứng với các tiêu chuẩn của Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thống (AOAC). Ứng dụng phương pháp này để xác định hàm lượng BPA trong 160 mẫu nước tiểu của người dân sống tại tỉnh Lạng Sơn cho thấy hàm lượng BPA trung bình nhân là 1,5 (CI 95%: 1,32 – 1,70) $\mu\text{g/g creatinin}$, trung vị là 1,48 (CI 95%: 1,24 – 1,67) $\mu\text{g/g creatinin}$.

Từ khóa: Bisphenol A (BPA), nước tiểu, LC-MS/MS, quy trình

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bisphenol A có công thức hoá học là $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$, được tổng hợp bằng cách ngưng tụ phenol và aceton trong môi trường axit ở điều kiện pH thấp, nhiệt độ cao. Bisphenol A có ứng dụng chính trong sản xuất nhựa polycarbonate và nhựa epoxy. Polycarbonate được sử dụng trong hộp đựng thực phẩm, trong khi nhựa epoxy được sử dụng trong lớp phủ bên trong của lon thực phẩm và đồ uống. Nguyên nhân chủ yếu dẫn đến sự xâm nhiễm BPA là do sự tồn dư của các BPA tự do chưa được polyme hoá hoặc giải phóng các BPA tự do qua quá trình thủy phân nhiệt từ trong quá trình sản xuất nhựa [1]. Việc sử dụng các sản phẩm nhựa PC trong các ngành công nghiệp thực phẩm và đồ uống dẫn đến sự phơi nhiễm BPA đáng kể ở người, đặc biệt ở các nước phát triển. Một số nghiên cứu

được công bố năm 2008 - 2013 ước tính hơn 90% người Mỹ và Đức từ sáu tuổi trở lên được xác định dương tính với BPA trong nước tiểu. Phơi nhiễm với BPA ảnh hưởng đến sự rối loạn nội tiết và chức năng sinh sản; làm thay đổi các đường truyền tín hiệu thần kinh; làm tăng khả năng mắc các bệnh ung thư, làm thúc đẩy tiến triển ung thư buồng trứng bằng cách trực tiếp gây tăng sinh tế bào.

Con người tiếp xúc với BPA từ các vật dụng hàng ngày được làm từ nhựa PC, hay khi nó rò rỉ từ hộp đựng thực phẩm và đồ uống có lót nhựa, chai nước, khi chúng liên tục được đun nóng hoặc rửa bằng chất tẩy rửa mạnh, hoặc khi chúng chứa chất lỏng có tính axit. BPA được hấp thụ bởi đường tiêu hóa và được

*Tác giả liên hệ

Email: huyena0810@gmail.com Điện thoại: (+84) 977555901 <https://doi.org/10.52163/yhc.v66iCD21.3824>

chuyển hóa ở gan thông qua quá trình glucuronid hóa, sau đó đào thải ra khỏi cơ thể qua mật hoặc nước tiểu dưới dạng BPA-glucuronide [2]. Ở người, BPA cũng đã được xác định trong huyết thanh, máu thai nhi, máu dây rốn, nước ối, mô nhau thai và sữa của bà mẹ đang cho con bú.

Trong hai thập kỷ qua, một số phương pháp phân tích đã được phát triển để xác định và đo lường BPA trong các mẫu sinh học và đã đạt được những cải tiến đáng kể về giới hạn phát hiện của các phương pháp này. Các phương pháp phân tích đã được phát triển để xác định BPA trong các mẫu sinh học của con người bao gồm xét nghiệm ELISA, GC-MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS và HPLC với đầu dò điện hóa hoặc huỳnh quang. Trong đó, phương pháp LC-MS/MS cho độ nhạy cao với giới hạn phát hiện thấp, độ chính xác cao. Trong những năm gần đây, đã có nhiều phương pháp và nghiên cứu đánh giá BPA bằng phương pháp LC-MS/MS như Calafat và Needham, 2008; Mahalingaiah và cộng sự, 2008; Nepomnaschy và cộng sự, 2009; Yang và cộng sự, 2009; Ye và cộng sự, 2009 [3].

Hiện nay, tại Việt Nam còn ít nghiên cứu và phân tích bisphenol A trong nước tiểu. Mục đích của nghiên cứu là xây dựng được quy trình phân tích Bisphenol A trong nước tiểu bằng sắc ký lỏng khối phổ đáp ứng độ nhạy, độ chính xác và đơn giản. Việc xây dựng kỹ thuật phân tích BPA trong nước tiểu, từ đó sử dụng BPA như là một chỉ số để giám sát sinh học trong ô nhiễm môi trường do BPA nói riêng và ô nhiễm môi trường nói chung.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Xét nghiệm và Phân tích, Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường.

2.1. Thiết bị, dụng cụ, hoá chất

- Thiết bị: Hệ thống sắc ký lỏng khối phổ (LC-MS/MS) Sciex-Qtrap 3200

- Dụng cụ: Cột dùng tách chiết (SPE) HLB (60 mg/3mL); Lọ (vial) nâu, dung tích 2 mL, loại dành cho phân tích BPA; Lọ (vial) nâu, dung tích 20 mL, loại dành cho phân tích BPA

- Hóa chất: Chất chuẩn Bisphenol A (độ tinh khiết 99,7%); Acetic acid (độ tinh khiết >99%); Amoniacetat (độ tinh khiết ≥97%); Amoniac (độ tinh khiết 25 – 30%); Chlohydric acid (độ tinh khiết 37%); Acetonitril (độ tinh khiết ≥99,9%); Methanol (độ tinh khiết ≥99,9%); Enzyme β-glucuronidase/

arylsulfatase; Mẫu chuẩn chứng nhận (CRM) ClinChek® Urine Control, lyophil for Phenolic compounds Level II; Nước siêu tinh khiết đã loại bỏ chất hữu cơ bằng máy Millipore MilliQ

2.2. Lấy mẫu, bảo quản mẫu

- Lấy mẫu nước tiểu: thu khoảng 10-20 mL nước tiểu giữa bãi vào các lọ thủy tinh đã được làm sạch trước với nắp có lớp lót polytetrafluoroethylen (PTFE)

- Mẫu được vận chuyển và được bảo quản ở 4°C. Mẫu được bảo quản ở - 20°C cho đến khi phân tích.

2.3. Chuẩn bị mẫu

Sử dụng 3 mL nước tiểu cho vào vial 20 mL, thêm 10 µL enzyme và 0,5 mL đệm amoniacetat 1M. Ủ hỗn hợp ở trên ở 37°C, 3 giờ. Sau khi ủ xong, cho thêm 1ml dung dịch amoniac 0,5%. Cột tách chiết pha rắn HLB được hoạt hoá bằng methanol và nước. Cho hỗn hợp đã ủ chảy qua cột HLB. Sau khi hỗn hợp chảy qua, tiến hành rửa cột bằng 2 mL HCl 0,1N và 2 mL methanol 10%. Rửa giải Bisphenol A trong cột bằng 1 mL methanol vào lọ (vial) 2 mL và đem đi phân tích trên hệ thống sắc ký lỏng khối phổ [4].

Xây dựng đường chuẩn: Chất chuẩn Bisphenol A được pha trong Acetonitril và chuẩn bị dãy chuẩn làm việc gồm 6 điểm chuẩn có nồng độ 2 µg/L, 4 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L, mẫu chuẩn chứng nhận (CRM).

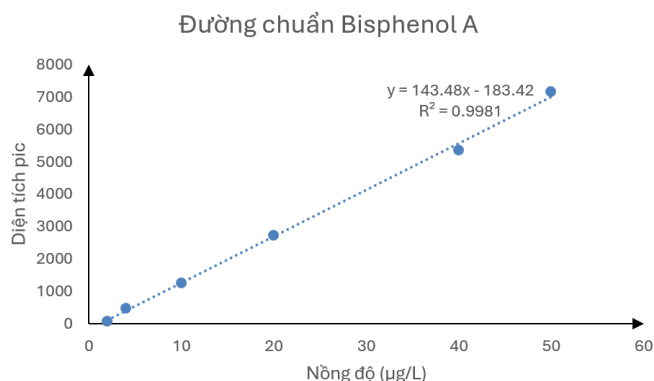
2.4. Chương trình phân tích trên hệ thống LC-MS/MS

Mẫu nước tiểu sau khi xử lý được xác định bằng thiết bị sắc ký lỏng khối phổ LC-MS/MS Sciex Qtrap 3200, sử dụng cột sắc ký Kinetex Phenyl-Hexyl 100A kích thước 150mm x 4,6 mm x 5µm với thể tích tiêm mẫu là 10 µL. Dung môi pha động sử dụng với kênh A là dung dịch amoniacetat 1mM và kênh B là Acetonitril. Tốc độ dòng 500 µL/phút, chương trình dung môi bắt đầu với 68% pha động kênh B (0÷0,5 phút) tăng dần đến 95% pha động kênh B (1÷4 phút) trước khi giảm về 68% pha động kênh B (5÷6 phút), nhiệt độ cột tách được duy trì ở 40°C. BPA được ion hóa nhờ kỹ thuật ion hóa phun điện tích (ESI) với chế độ âm tại điện thế 4,5 kV. Nhiệt độ nguồn ion hoá 450°C, chế độ đo quan trắc phổ khối 2 lần MRM (multiple reaction monitoring). Các mảnh ion m/z: 227,1/211,1 và 227,1/132,8.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Xây dựng đường chuẩn

Xây dựng đường chuẩn với các điểm chuẩn có nồng độ 2 µg/L, 4 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 40 µg/L, 50 µg/L ta thu được kết quả:



Hình 1: Đường chuẩn BPA

Khoảng tuyến tính của phép đo có phương trình hồi quy $y = 143,48x - 183,42$ với hệ số tương quan tương quan $R=0,9990$ đạt yêu cầu $0,995 \leq R \leq 1$, hệ số xác định $R^2 = 0,9981$ đạt yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$

3.2. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Để xác định LOD của phương pháp, tiến hành phân tích 7 lần của mẫu nước tiểu có nồng độ Bisphenol A thấp đã được khảo sát trước và kí hiệu mẫu lần lượt $T_1, T_2, T_3, T_4, T_5, T_6, T_7$ ta thu được kết quả như sau:

3.3. Độ chính xác của phương pháp (độ thu hồi và độ lặp lại)

Để xác định độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp, chúng tôi tiến hành phân tích ở mẫu thực thêm chuẩn ở các nồng độ 4 µg/L và 20 µg/L, mẫu

Bảng 1: Giới hạn phát hiện của phương pháp (LOD)

STT	Tên mẫu	Hàm lượng BPA trong mẫu (µg/L)
1	T1	0,57
2	T2	0,52
3	T3	0,55
4	T4	0,53
5	T5	0,58
6	T6	0,55
7	T7	0,52
C_{TB}		0,55
SD		0,02
LOD		0,06

C_{TB} : Hàm lượng Bisphenol A trung bình

$LOD = 3 \times SD$;

SD: Độ lệch chuẩn.

Qua kết quả thực nghiệm chúng tôi thu được kết quả giá trị LOD là 0,06 µg/L và LOQ lý thuyết được tính bằng 3 lần giá trị LOD. Chúng tôi sử dụng thử nghiệm LOQ bằng cách dựa trên độ đúng và độ chụm của phương pháp, do đó LOQ có thể được tính là hàm lượng thấp nhất có thể đạt được yêu cầu độ đúng và độ chụm và kết quả LOQ thực tế 1 µg/L với độ đúng là 84,69% và độ chụm là 5,03%. Kết quả LOD thu được thấp hơn so với kết quả của tác giả Calafat và Needham (2008) là 2,6 µg/L; của tác giả Nepomnaschy et al. (2009) là 1,82 µg/L; của tác giả Mahalingaiah và cộng sự (2008) là 1,3 µg/L; của tác giả Wolff et al. (2007) là 2,0 µg/L [3]. So sánh giá trị LOQ của phương pháp xác định bisphenol A bằng LC-MS/MS, nghiên cứu của chúng tôi có LOQ thấp hơn LOQ công bố của Myridakis và cộng sự (2015) là 2,69 µg/L [5] và cao hơn Anderson và cộng sự (2014) công bố là 0,75 µg/L [6].

chuẩn chứng nhận (CRM). Thực hiện phân tích lặp lại 7 lần, kết quả thu được như sau:

Bảng 2: Độ thu hồi, độ lặp lại của phương pháp

STT	Nồng độ BPA (µg/L)	Hiệu suất thu hồi	Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) (%)	AOAC (Độ thu hồi)	AOAC (RSD) (%)
1	Mẫu thêm chuẩn 4 µg/L	78,54 - 99,35%	5,95	60-115%	< 21
2	Mẫu thêm chuẩn 20 µg/L	88,43 - 98,60%	3,61	80-110%	< 15
3	Mẫu CRM: 3,57-5,94 µg/L	86,69 - 105,15%	6,85	60-115%	< 21

AOAC: Hiệp hội các nhà hóa phân tích chính thống - Association of Official Analytical Chemists

Kết quả theo bảng 2 cho thấy độ thu hồi và độ lặp lại của phương pháp ở các nồng độ chuẩn đều đạt theo tiêu chuẩn của AOAC. So sánh độ thu hồi mà Anderson cùng các cộng sự công bố (2014) dao động từ khoảng 90,88-102,92% [6]. Theo Myridakis và cộng sự (2015) độ thu hồi phương pháp trên LC-MS/MS là 75,2-88% [5]. Từ kết quả thu được cho thấy độ thu hồi của phương pháp phân tích Bisphenol A bằng phương pháp LC-MS/MS đạt yêu cầu.

3.4. Kết quả phân tích hàm lượng BPA trên mẫu thực

Ứng dụng phương pháp phân tích để xác định hàm lượng của BPA trong 160 mẫu nước tiểu của người dân tại Lạng Sơn. Mẫu nước tiểu được thu thập đã thông qua hội đồng đạo đức của Viện Sức khỏe nghề nghiệp và Môi trường theo giấy chứng nhận số 01/GCN-HĐĐĐ. Kết quả cho thấy hàm lượng BPA trung bình nhân là 1,5 (CI 95%: 1,32 – 1,70) µg/g creatinin, trung vị là 1,48 (CI 95%: 1,24 – 1,67) µg/g creatinin. Tất cả các mẫu phân tích đều phát hiện nồng độ BPA, chiếm tỉ lệ 100%, cho thấy sự phơi nhiễm rộng rãi của BPA trong cuộc sống hàng ngày. Nồng độ BPA trung bình nhân trong nghiên cứu của chúng tôi là 1,50 µg/g creatinine có cùng mức độ với nồng độ được báo cáo của Van Den Heuvel và cộng sự, 2020 ở 150 người dân nước Bỉ trong độ tuổi từ 23-40 tuổi từ năm 2011-2013 là 1,59 µg/g creatinine [7] và 1,669 µg/g creatinine theo nghiên cứu của Carolin Tschersich và cộng sự từ năm 2014-2017 trên 515 người dân ở Đức [8] và cao hơn nghiên cứu của Antonia M. Calafat và cộng sự, 2005 [9] ở 394 người dân Mỹ (1,33 µg/g creatinine), 520 người dân Trung Quốc từ năm 2012-2013 là 0,78 µg/g creatinine (Yi-Xin Wang và cộng sự, 2019) [10].

4. KẾT LUẬN

Quy trình kỹ thuật phân tích BPA trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam đáp ứng độ nhạy, độ chính xác của phương pháp. Việc xây dựng bộ dữ liệu về giá trị tham chiếu về nồng độ BPA trong nước tiểu của người dân giúp cho các nhà khoa học sử dụng làm tài liệu tham chiếu trong các nghiên cứu khoa học cũng như trong việc phòng chống phơi nhiễm với BPA trong môi trường.

5. LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ độc lập cấp quốc gia **“Nghiên cứu xây dựng bộ chỉ số hóa sinh cơ bản về độc chất học môi trường trên người Việt Nam tuổi lao động”**, mã số đề tài ĐTĐL.CN-39/21.

6. TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] None N. (2001). Chemical study on Bisphenol A.
- [2] Khan N.G., Correia J., Adiga D., et al. (2021). A comprehensive review on the carcinogenic potential of bisphenol A: clues and evidence. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(16), 19643–19663.
- [3] Battal D., Cok I., Unlusayin I., et al. (2014). Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantitative analysis of free and conjugated bisphenol A in human urine. *Biomedical Chromatography*, 28(5), 686–693.
- [4] Liao C. and Kannan K. (2012). Determination of Free and Conjugated Forms of Bisphenol A in Human Urine and Serum by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Environ Sci Technol*, 46(9), 5003–5009.
- [5] Myridakis A., Balaska E., Gkaitatzi C., et al. (2015). Determination and separation of bisphenol A, phthalate metabolites and structural isomers of parabens in human urine with conventional high-pressure liquid chromatography combined with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 407(9), 2509–2518.
- [6] Anderson D.J., Brozek E.M., Cox K.J., et al. (2014). Biomonitoring method for bisphenol A in human urine by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 953–954, 53–61.
- [7] Van Den Heuvel R., Den Hond E., Colles A., et al. (2020). Biobank@VITO: Biobanking the General Population in Flanders. *Front Med (Lausanne)*, 7, 37.

- [8] Tschersich C., Murawski A., Schwedler G., et al. (2021). Bisphenol A and six other environmental phenols in urine of children and adolescents in Germany - human biomonitoring results of the German Environmental Survey 2014-2017 (GerES V). *Sci Total Environ*, 763, 144615.
- [9] Calafat A.M., Kuklenyik Z., Reidy J.A., et al. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 113(4), 391–395.
- [10] Wang Y.-X., Liu C., Shen Y., et al. (2019). Urinary levels of bisphenol A, F and S and markers of oxidative stress among healthy adult men: Variability and association analysis. *Environment International*, 123, 301–309.

