

# 超高效液相色谱-质谱法测定人体尿液中羟基多环芳烃

石金刚, 江婉琪, 贺淼, 田福林

(1.环境应激与慢病防控教育部重点实验室(中国医科大学); 中国医科大学 公共卫生学院,  
沈阳 110122)

**摘要:** 本案例建立了一种超高效液相色谱串联质谱法测定尿中 13 种羟基多环芳烃的方法, 色谱条件: 色谱柱: Symmetry C18 (4.6 mm\*250 mm, 5  $\mu$ m), 流速为 500  $\mu$ L/min, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 进样量为 10  $\mu$ L。实验结果表明: 在 0.01-50.0  $\mu$ g/L 的浓度范围内, 目标物的标准曲线相关系数均大于 0.996, 精密度为 2.21%-14.25%, 尿液样品中目标物的加标回收率为 74.62%-126.18%。

**关键词:** 羟基多环芳烃; 尿液; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: X 文献标识码:

## Determination of Hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

SHI Jingang, JIANG Wanqi, He Miao, TIAN Fulin

(Key Laboratory of Environmental Stress and Chronic Disease Control & Prevention (China Medical University),  
Ministry of Education, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110122, China)

**Abstract:** A method for the determination of 13 OH-PAHs in urine by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was established. The chromatographic conditions were as follows: Symmetry C18 column (4.6 mm\*250 mm, 5  $\mu$ m), the flow rate was 500  $\mu$ L/min, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the sample size was 10  $\mu$ L. The experimental results showed that in the concentration range of 0.01-50.0  $\mu$ g/L, the correlation coefficients of the standard curves of the target were all greater than 0.996, the precision was 2.21%-14.25%, and the recoveries of the target in the urine samples were 74.62%-126.18%.

**Keywords:** Hydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons, urine, Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

# 1 材料和方法

## 1.1 实验试剂

用于检测羟基多环芳烃 (OH-PAHs) 的 13 种单标及 2 种内标物质的名称、结构式和详细信息见表 1。

表 1 OH-PAHs 以及内标的标样基本信息

目标物	简写	结构式	纯度	公司
2-羟基萘	2-OHN		99.26%	德国 Dr. Ehrenstorfer 公司
1-羟基萘	1-OHN		99.62%	德国 Dr. Ehrenstorfer 公司
3-羟基芴	3-OHF		97.00%	加拿大 Toronto Research Chemicals 公司
2-羟基芴	2-OHF		98.00%	美国 Sigma 公司
2-羟基菲	2-OHP		94.00%	德国 Dr. Ehrenstorfer 公司
3-羟基菲	3-OHP		99.50%	德国 Dr. Ehrenstorfer 公司
1-羟基菲	1-OHP		99.70%	德国 Dr. Ehrenstorfer 公司
1-羟基芘	1-OHPyr		98.00%	美国 Sigma 公司
3-羟基蒽	3-OHC		98.00%	加拿大 Toronto Research Chemicals 公司
6-羟基蒽	6-OHC		100.0%	美国 AccuStandard 公司
3-羟基苯并[a]蒽	3-OHBAA		98.00%	加拿大 Toronto Research Chemicals 公司
9-羟基苯并[a]蒽	9-OHBAP		96.00%	加拿大 Toronto Research Chemicals 公司
3-羟基苯并[a]芘	3-OHBAP		95.00%	加拿大 Toronto Research Chemicals 公司
内标	3-OHP- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>		≥ 98.00%	美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司
	6-OHC- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>		≥ 98.00%	美国 Cambridge Isotope Laboratories 公司

甲醇（优级纯）	德国 Merck 公司
乙酸铵（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司
冰醋酸（分析纯）	国药集团化学试剂有限公司

## 1.2 主要实验仪器及设备

超高效液相色谱-三重四级杆质谱	美国 Agilent 公司
24 位固相萃取真空装置	上海安谱实验科技股份有限公司
超纯水机	美国 Millipore 公司
氮吹仪	上海欧陆科仪有限公司
电子天平	美国 METTLER TOLEDO 公司
酶标仪	瑞士 TECAN 公司
气浴恒温振荡器	上海力辰科技邦西仪器科技有限公司
离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司
微孔板恒温振荡器	杭州瑞诚仪器有限公司
Envi-18 SPE 小柱	美国 supelco 公司
Symmetry C18 色谱柱	美国 Waters 公司

## 1.3 溶液配制

### 1.3.1 尿中 13 种 OH-PAHs 标准溶液配制

以甲醇为溶剂将 13 种 OH-PAHs 的固体标样溶解为质量浓度 2 mg/mL 的单标储备液，准确量取各单标储备液，混合后用甲醇稀释成混标储备液，-20 °C 避光保存备用。

### 1.3.2 内标溶液配制

分别准确量取 50 μg/mL 的 3-OHP-13C6 和 6-OHC-13C6 内标储备液适量，用甲醇稀释成质量浓度为 25 μg/mL 的混合内标中间液，于 -20 °C 冰箱避光保存；取适量混合内标中间液稀释成 100 μg/L 的混合内标使用液，于 4 °C 冰箱避光保存。

## 1.4 尿液样品前处理

将冷冻尿液样品室温解冻后，3000 r/min 离心 10 分钟，吸取 10 mL 上清液，转移至 50 mL 离心管中，分别加入 10 mL 饱和乙酸-乙酸铵缓冲溶液、50 μL 100 μg/L 混合内标溶液和 30 μL β-葡萄糖醛苷酸酶/芳基硫酸酯酶，振荡混匀后，置于 37 °C 气浴恒温振荡器中避光酶解 16 小时。固相萃取：Envi-18 SPE 小柱用 5 mL 甲醇活化和 10 mL 超纯水平衡后，将酶解后尿样通过小柱净化富集，再用 3 mL 的超纯水淋洗，抽干小柱，之后用 5 mL 甲醇洗脱小

柱，洗脱液流至 10 mL 离心管中。浓缩：将洗脱液氮吹至近 500  $\mu$ L，经 0.22  $\mu$ m 针头式过滤器过滤后转移到进样瓶中待测。

### 1.5 仪器分析条件

使用超高效液相色谱-三重四级杆质谱（HPLC-MS/MS）进行上机检测，采用 Symmetry C18（4.6 mm\*250 mm,5  $\mu$ m）作为液相色谱柱，流动相 A 为甲醇，流动相 B 为超纯水，梯度洗脱：0~25 min: 65%~100%甲醇；25~28 min: 100%~65%甲醇；28~30 min: 65%甲醇。流速为 500  $\mu$ L/min，柱温为 30  $^{\circ}$ C，进样量为 10  $\mu$ L，质谱检测条件见表 2。

表 2 OH-PAHs 的质谱参数

目标 化合物	母离子 质荷比	子离子 质荷比	保留时间/min
2-OHN	143.0	115.0*/143.1	10.9
1-OHN	143.0	115.0*/143.1	11.6
3-OHF	181.0	153.0/180.0*	14.5
2-OHF	181.0	153.0/180.0*	14.9
2-OHP	193.0	165.1*/192.0	15.9
3-OHP	193.0	165.1*/192.0	15.9
1-OHP	193.0	165.1*/192.0	16.9
1-OHPyr	217.0	189.0*/216.0	20.2
3-OHC	243.3	215.2*/241.1	21.8
6-OHC	243.3	215.2*/241.1	22.1
3-OHBAA	243.3	215.2*/241.1	22.3
9-OHBAP	267.0	239.0*/267.1	25.6
3-OHBAP	267.0	239.0*/267.1	27.1

注：\*定量离子

### 1.6 样品测定

尿液样品经前处理后按照“1.5 仪器分析条件”进行测定。3-OHP-13C6 为 2-OHN、1-OHN、3-OHF、2-OHF、2-OHP、3-OHP 和 1-OHP 内标，6-OHC-13C6 为 1-OHPyr、3-OHC、6-OHC、3-OHBAA、9-OHBAP 和 3-OHBAP 内标，采用离子对和保留时间定性，内标法进行定量分析。OH-PAHs 及内标物标准色谱图见图 1。

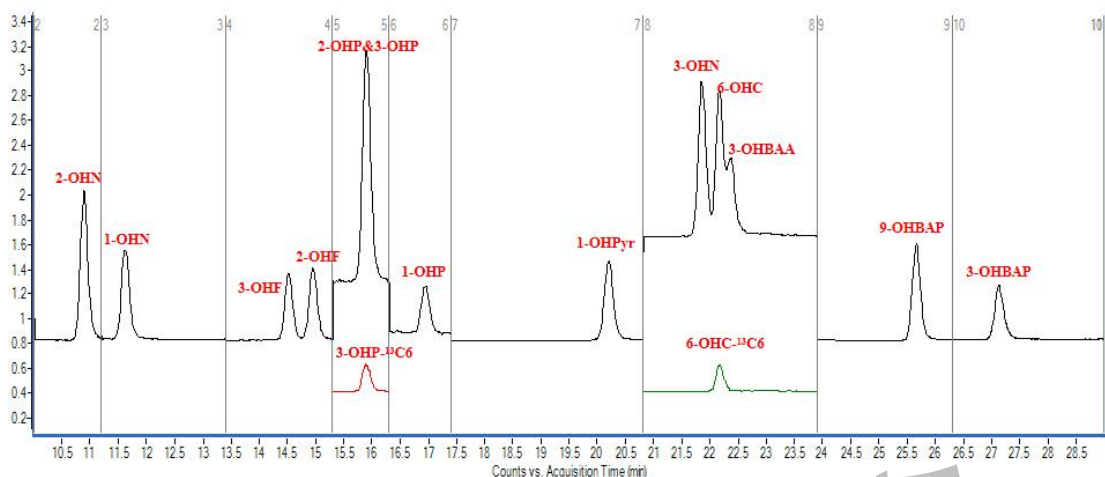


图 1 OH-PAHs 目标化合物及内标物标准色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 前处理方法

#### 2.1.1 SPE 小柱干燥时间的确定

Envi-18 SPE 固相萃取小柱是反向柱，载入经过酶解的尿液样品后，弱极性的 OH-PAHs 目标物被吸附于 SPE 小柱的填料上，待极性的杂质被淋洗干净后，使用有机溶剂甲醇作为洗脱溶剂，洗脱吸附于固相萃取填料上的弱极性目标物。本研究中使用水作为淋洗溶剂淋洗尿液中的水溶性盐等杂质，在淋洗之后需要将 Envi-18 SPE 固相萃取小柱干燥，因为小柱中残余的水会在甲醇洗脱时随甲醇洗脱下来流入洗脱液中，影响后续氮吹效率。考察不同干燥时间对目标物回收率的影响，图 2 结果显示，干燥 15 min 和 45 min 时目标物回收率较低，而干燥 60 min 和 90 min 时各种目标物回收率整体较高，且 90 min 和 60 min 相比回收率没有明显提高，所以 SPE 小柱干燥时间选择为 60 min。

#### 2.1.2 洗脱溶剂体积的确定

为了保证尿液中 OH-PAHs 目标物被完全洗脱，本研究中设置 5 mL、7.5 mL、10 mL 三种不同洗脱体积，考察不同甲醇洗脱体积对目标物回收率的影响，结果如图 2 所示，7.5 mL、10 mL 甲醇洗脱与 5 mL 甲醇洗脱相比，对回收率的影响无明显改变，说明 5 mL 甲醇就可以达到较好的洗脱效果，考虑节省溶剂和后续氮吹效率，所以选择洗脱溶剂体积为 5 mL。

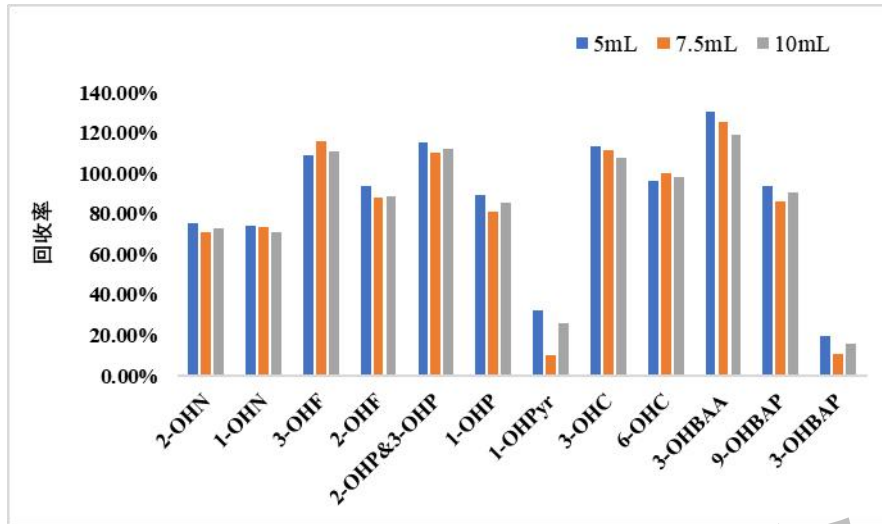


图 2 洗脱体积对目标物回收率影响

## 2.2 方法学评价

### 2.2.1 线性范围

本研究中设置目标化合物质量浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.0、50.0  $\mu\text{g/L}$ ，内标质量浓度为 20.0  $\mu\text{g/L}$  的标准工作曲线。以被测目标化合物质量浓度为横坐标，被测目标化合物与内标物定量离子峰面积比为纵坐标，进行线性回归分析，得到 13 种目标化合物的线性方程和相关系数。结果如表 3 所示，各目标化合物在浓度范围内线性关系良好。

### 2.2.2 检出限与定量限

以标准曲线最低浓度点对应的 3 倍信噪比质量浓度定义目标化合物的检出限(Limits of detection, LOD)，10 倍信噪比质量浓度定义目标化合物的定量限 (Limits of quantification, LOQ)，计算结果见表 4。

表 3 目标化合物线性方程及线性范围

目标物名称	线性方程	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	相关系数 R
2-OHN	$y=1.8425x+0.0216$	0.01-50	0.998
1-OHN	$y=0.6091x+0.0234$	0.01-50	0.999
3-OHF	$y=0.3643x+0.0036$	0.01-50	0.997
2-OHF	$y=4.2458x+0.0863$	0.01-50	0.996
2-OHP&3-OHP	$y=1.5794x+0.0274$	0.01-50	0.999
1-OHP	$y=0.9856x+0.0107$	0.01-50	0.998
1-OHPyr	$y=3.7296x+0.0347$	0.01-50	0.999

3-OHC	$y=2.5764x+0.0475$	0.01-50	0.997
6-OHC	$y=2.6675x+0.0742$	0.01-50	0.999
3-OHBAA	$y=0.5978x+0.0072$	0.01-50	0.999
9-OHBAP	$y=0.3935x+0.0102$	0.01-50	0.998
3-OHBAP	$y=0.5904x-0.0294$	0.01-50	0.998

表 4 目标化合物检出限及定量限

目标物名称	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
2-OHN	0.002	0.006
1-OHN	0.018	0.060
3-OHF	0.001	0.003
2-OHF	0.001	0.003
2-OHP&3-OHP	0.002	0.006
1-OHP	0.001	0.003
1-OHPyr	0.001	0.003
3-OHC	0.002	0.006
6-OHC	0.003	0.010
3-OHBAA	0.020	0.067
9-OHBAP	0.020	0.067
3-OHBAP	0.020	0.067

### 2.2.3 准确度与精密度

取一不含多环芳烃羟基代谢物的实际尿液样品，分别在 3 ng 和 10 ng 两种加标量水平下做加标回收率实验，每个加标样品做 3 个平行样。采用优化后样品前处理方法上机检测后，计算加标回收率及相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD)。准确度以加标回收率表示，精密度以 RSD 表示。除 1-OHPyr 和 3-OHBAP 两种目标化合物外，其余 11 种目标化合物的回收率为 74.62% - 126.18%，RSD 为 2.21% - 14.25%，详见表 5。

表 5 目标化合物加标回收率及相对标准偏差

目标化合物	加标量 (3 ng)		加标量 (10 ng)	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
2-OHN	76.14	2.57	75.63	3.40

1-OHN	74.62	2.21	75.03	6.10
3-OHF	107.47	5.88	112.34	7.02
2-OHF	96.04	2.28	90.99	8.07
2-OHP&3-OHP	108.53	7.42	109.88	7.65
1-OHP	95.39	5.58	85.39	2.10
1-OHPyr	28.60	12.47	36.58	11.13
3-OHC	113.00	2.83	115.66	4.25
6-OHC	95.99	4.35	97.57	2.23
3-OHBAA	126.18	4.06	115.64	5.29
9-OHBAP	95.85	2.47	78.00	6.40
3-OHBAP	19.96	14.25	21.51	11.32

### 2.3 结论

以上实验结果可知，在 0.01-50.0 $\mu\text{g/L}$  的浓度范围内，目标物的标准曲线相关系数均大于 0.996，精密度为 2.21%-14.25%，尿液样品中目标物的加标回收率为 74.62%-126.18%。采用超高效液相色谱串联质谱测定尿中 13 种多环芳烃羟基代谢物，方法稳定可靠，目标物线性范围良好，灵敏度高，有很好的重复性，能够对样本进行准确定量。