

固相支撑液液萃取-液相色谱-串联质谱法 测定尿液中 10 种单羟基多环芳烃

商婷^{1,2} 赵灵娟¹ 李佩^{1,2} 曾祥英¹ 于志强^{*1}

¹(中国科学院广州地球化学研究所, 有机地球化学国家重点实验室,
广东省环境资源利用与保护重点实验室, 广州 510640)

²(中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 通过检测人体尿液中多种羟基多环芳烃(OH-PAHs)的浓度可全面评估多环芳烃(PAHs)在人体的负荷水平。本研究建立并优化了一种基于固相支撑液液萃取(SLE)的前处理技术,在此基础上,利用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定人体尿液中的 10 种 OH-PAHs。尿样采用硅藻土 SLE 柱进行富集净化,二氯甲烷-正己烷(3:7, V/V)混合溶液作为目标化合物的洗脱液。前处理优化结果表明,与传统方法相比,本方法具有较好的回收率,同时可有效降低生物基质的干扰。本方法在 3 个加标浓度水平(10, 50 和 100 $\mu\text{g/L}$)下的回收率为 88.5% ~ 120.9%,重复性精密度范围为 1.6% ~ 8.1%。检出限与定量限分别在 0.06 ~ 0.3 $\mu\text{g/L}$ 和 0.2 ~ 1.0 $\mu\text{g/L}$ 之间。本方法成功用于广东省小学生尿液中 OH-PAHs 的测定,结果表明,2-OHN 是最主要的检出化合物,最高浓度达到 4.83 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词 单羟基多环芳烃; 尿液; 固相支撑液液萃取; 液相色谱-串联质谱

1 引言

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是指分子中具有两个或两个以上苯环的一类碳氢化合物,其主要来源是煤、石油、木材等不完全燃烧或热裂解产物^[1]。PAHs 可通过呼吸道、皮肤和消化道等多种暴露途径进入人体,经体内代谢形成羟基多环芳烃(OH-PAHs),并以葡萄糖醛酸、硫酸磺结合物的形式主要通过尿液排泄^[2]。由于它们具有潜在的“三致”(致癌、致畸、致突变)效应以及在全球分布的广泛性^[3],PAH 对人体健康的潜在危害成为世界各国广泛关注的环境污染问题,人体内暴露水平的评估是开展 PAHs 健康风险评价的重要基础科学数据。

已有研究显示,尿中 PAHs 代谢物的测定通常与 PAHs 暴露密切相关^[4]。由 2~4 个苯环组成的分子量较小的 OH-PAHs,主要通过尿液排泄,而分子量较高的 OH-PAHs(苯环数量>4)主要通过粪便排泄^[5,6]。由于 PAHs 的暴露途径复杂多变,各种暴露途径对人体内暴露的贡献难以准确评估,因此,人体尿液中 OH-PAH 的测定成为评价 PAH 内暴露水平的重要生物标志物。目前,固相萃取(SPE)^[6~11]与液液萃取(LLE)^[12~17]是应用最广泛的样品前处理方法。SPE 具有重现性稳定以及装置价格合理、易于获取等特点,但样品前处理使用相应的萃取柱时需活化、平衡和清洗等步骤,耗时耗力。LLE 常用溶剂有戊烷、二氯甲烷和正己烷等,选择性高,分离效果较好,但操作复杂,溶剂使用量大,且易产生乳化现象导致重复性较差,且上述前处理技术存在目标化合物回收率不稳定、生物基质干扰严重等技术难点,无法满足流行病学大样本量研究的需求,因此,开发快速、高效的前处理技术成为 OH-PAHs 内暴露研究的重要内容。

SLE 柱采用了特殊工艺处理过的硅藻土,拥有最大的比表面积和最低的表面活性,能提供一个理想的液液分配的支撑表面,可代替大部分传统的 LLE 方法^[18]。在传统 LLE 方法基础上,SLE 方法利用分析物在两相中不同的溶解度和分配比,采用经过高度改良的具有高比表面积的多孔硅藻土作为吸附剂,结合其吸水性强、化学惰性等特点,快速吸附样品基质中的水分,使目标物与水分分离,具有不易产生乳化

现象、基质效应降低和需要样品量少等优点^[19]。样品前处理时,使用相应的萃取柱,仅需上样和洗脱两步,即可从水相中萃取目标化合物。当加入水性生物样品时,样品在填料的表面扩散并被吸收,从而形成萃取界面,相当于 LLE 的界面,当与水不相溶的有机溶剂加入后,目标分析物被有机溶剂溶解并收集下来。相较于 LLE、SPE 等传统尿液前处理方法,SLE 可有效提高样品的提取能力和效率,已广泛应用于人体尿液和血液样品的前处理^[20~28],如 Meunier 等^[28]用甲基叔丁基醚提取血浆样品的醛固酮,方法方便简单。Liu 等^[23]利用正己烷萃取人体血液和尿液中的多环麝香,无需调节 pH 值和盐度,样品制备时间显著缩短(~15 min)。上述研究结果表明,利用 SLE 方法可以对生物体液中的污染物进行高通量分析。

本研究选择人尿液中的 1-羟基萘(1-OHN)、2-羟基萘(2-OHN)、2-羟基芴(2-OHF)、3-羟基芴(3-OHF)、1-羟基菲(1-OHPhe)、2-羟基菲(2-OHPhe)、3-羟基菲(3-OHPhe)、4-羟基菲(4-OHPhe)、9-羟基菲(9-OHPhe)和 1-羟基蒽(1-OHP)共 10 种 OH-PAHs 为目标物,通过 SLE 洗脱溶剂的筛选和优化,确定前处理富集净化方法,然后使用 LC-MS/MS 技术对其进行定性和定量分析,为尿液中常见的 PAHs 代谢产物检测提供了科学依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 型液相色谱仪(LC,美国 Agilent 公司)-API4000 三重四极杆质谱仪(MS/MS,美国 AB SCIEX 公司); Heraeus™ Labofuge™200 台式离心机(美国 Thermo Fisher 公司); 氮吹仪(美国 Pierce 公司); 12 孔固相萃取装置(美国 Supelco 公司); Milli-Q Unique-R10 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 0.2 μm 聚四氟乙烯膜滤头(上海安谱科学仪器有限公司); 5-mL SLE 固相支撑液液萃取小柱(瑞典 Biotage 公司)。

正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲基叔丁基醚、正戊烷、甲苯和甲醇等有机溶剂均为色谱级(99.9%,德国 Merck 公司); 醋酸钠和冰醋酸(99.97%,美国 Tedia 公司); HCl(质量分数为 37%,德国 Sigma-Aldrich 公司); β-葡萄糖苷酸-芳基硫酸酯酶(美国 Sigma 公司,含 122400 单位/mL β-葡萄糖苷酸酯酶和 3610 单位/mL 芳基硫酸酯酶); 实验用水为超纯水(18.2 MΩ·cm)。

10 种 OH-PAHs 标样(1-OHN、2-OHN、2-OHF、3-OHF、1-OHPhe、2-OHPhe、3-OHPhe、4-OHPhe、9-OHPhe 和 1-OHP)均购于美国 Supelco 公司; 同位素标记的标样(D₈-1-OHN 和 D₉-1-OHP)来自美国剑桥同位素实验室。

2.2 尿液样品采集

尿液样本的采集对象为广州市某小学四年级学生,所有志愿者均自愿参加,并在家长的引导下签署同意书,本研究随机选取了 20 例尿液样本进行检测,对方法应用进行验证。尿液样本采集后保存于预先处理过的聚乙烯塑料瓶中,于-80℃放置备用。

随机采取实验室志愿者(22~28 岁)尿液 10 例,每例取 10 mL 进行混合,形成的混合尿液基质用于方法优化。

2.3 样品前处理

样品置于室温下解冻后,3000 r/min 离心 10 min,取上清液,准确量取 2 mL,加入 10 ng 回收率指示物(D₈-1-OHN 和 D₉-1-OHP),加 1 mol/L HCl 溶液与醋酸-醋酸钠缓冲溶液调节样品至 pH 5.0,加 β-葡萄糖苷酸-芳基硫酸酯酶 20 μL,充分混匀,置于恒温振荡器中于 37℃下避光酶解 16 h。将酶解后的样品加入固相支撑液液萃取小柱中,施加 2~10 s 的真空或正压,等待 5 min,使样品分散并充分吸附于填料表面。以 5 mL 二氯甲烷-正己烷(3:7, V/V)混合溶液作为洗脱溶剂,连续洗脱 3 次,合并收集到的洗脱液进行氮吹,以甲醇定容至 400 μL。用 0.2 μm 的尼龙膜过滤后,于-20℃保存,备用。

2.4 仪器分析

采用 Eclipse-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Agilent 公司)为色谱分析柱,进样量为 10 μL,以水(A)和甲醇(B)为流动相,流速为 0.6 mL/min,梯度洗脱程序: 0~5 min, 60% B; 5~14 min, 60%~78% B; 14~21 min, 78%~85% B; 21~30 min, 85%~100% B; 30~35 min, 100% B; 35~

39 min, 100% ~ 60% B; 39 ~ 45 min, 60% B。质谱检测采用电喷雾离子源(ESI), 负离子模式, 电压 4500 V, 离子源温度 450℃, 雾化气压力 50 psi, 辅助气压力 60 psi, 帘帘气压力 30 psi; 采用多反应监测模式(MRM)。各目标化合物保留时间和定性定量离子对见表 1。

表 1 OH-PAHs 及其回收率指示物的质谱参数

Table 1 Mass spectrometry parameters for monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs) and surrogates

化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ion (<i>m/z</i>)	去簇电势 Declustering potential (V)	碰撞能 Collision energy (eV)
1-Hydroxynaphthalene (1-OHN)	13.6	142.9	114.9	-80	-36
2-Hydroxynaphthalene (2-OHN)	12.5	142.9	114.9	-80	-36
2-Hydroxyfluorene (2-OHF)	17.7	180.9	179.9	-70	-35
3-Hydroxyfluorene (3-OHF)	17.7	180.9	179.9	-70	-35
1-Hydroxyphenanthrene (1-OHPhe)	19.9	192.9	164.9	-80	-40
2-Hydroxyphenanthrene (2-OHPhe)	18.9	192.9	164.9	-80	-40
3-Hydroxyphenanthrene (3-OHPhe)	19.2	192.9	164.9	-80	-40
4-Hydroxyphenanthrene (4-OHPhe)	20.5	192.9	164.9	-80	-40
9-Hydroxyphenanthrene (9-OHPhe)	19.2	192.9	164.9	-80	-40
1-Hydroxypyrene (1-OHP)	23.1	216.9	188.9	-80	-43
D ₈ -1-hydroxynaphthalene (D ₈ -1-OHN)	13.6	149.9	121.9	-80	-36
D ₉ -1-hydroxypyrene (D ₉ -1-OHP)	23.0	225.9	197.9	-80	-40

3 结果与讨论

3.1 洗脱溶剂的优化

用于 SLE 柱的洗脱溶剂需与水不混溶,同时对 OH-PAH 具有良好的溶解性,因此溶剂的选择主要取决于目标物的溶解度和极性等特性。对于非极性化合物,非极性溶剂(如庚烷、戊烷、己烷)较为理想,而弱极性化合物,需选择有一定极性的有机溶剂,如甲基叔丁基醚、二氯甲烷或乙酸乙酯。目标 OH-PAHs 的 pK_a 值在 8.0 ~ 9.2 之间,具有弱极性。基于此,选取正己烷(Hex)、甲苯(MB)、戊烷(Pen)、二氯甲烷(DCM)、乙酸乙酯(EtAC)、甲基叔丁基醚(MTBE)作为洗脱溶剂进行优化,通过 10 种 OH-PAHs 的回收率进行评价。

不同溶剂体系对 10 种 OH-PAHs 回收率的影响如图 1 所示,每种溶剂对 OH-PAHs 都有一定洗脱效率,其中 DCM 对各目标化合物的回收率均较理想。但由于 DCM 极性较强,洗脱能力随之增强,因此洗脱下来的化合物相对较多,在 LC-MS/MS 进样时发现具有较

多的非目标化合物被检测到,因此本研究中进一步考虑采用 Hex-DCM 混合体系,并对 Hex-DCM 不同配比时的混合溶剂的洗脱能力进行考察。结果表明,当洗脱溶剂 Hex-DCM 的配比为 7:3 (V/V) 时,所有目标物的回收率均理想,且色谱峰的干扰较小;当 DCM 配比增加时,回收率无明显提高而干扰峰增加。最终选择 DCM-Hex(3:7, V/V) 混合溶剂作为洗脱溶剂。

对洗脱溶剂的使用量进行了优化。洗脱溶剂使用量对回收率的影响见图 2,采用 1 × 5 mL 混合溶剂洗脱目标化合物,除 1-OHP 外,其余化合物回收率均高于 90%,使用 3 × 5 mL 混合溶剂时 10 种 OH-PAHs 的回收率均高于 95.0%。因此洗脱次数最终设定为 3 次,优化的洗脱液的体积为 15 mL。

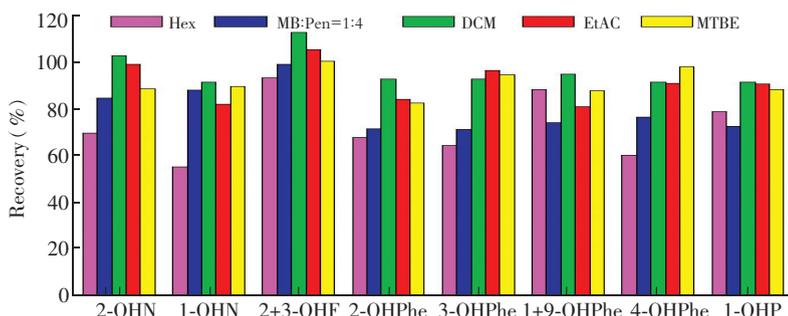


图 1 洗脱溶剂对回收率的影响

Fig. 1 Effect of elution solvent on recoveries of OH-PAHs

3.2 方法评价

尿液基质为 10 例志愿者尿液的等体积混合液。采用标准加入法考察本方法的回收率, 由于混合尿液基质中广泛存在 OH-PAHs, 因此同时进行加标基质和空白基质的前处理, 每个加标浓度进行 6 次重复实验。从回收率、重复性及基质效应等 3 方面对建立的方法进行评价, 并与目前广泛使用的固相萃取方法进行对比。

评价方法中分别进行低浓度 (10 $\mu\text{g/L}$)、中浓度 (50 $\mu\text{g/L}$) 和高浓度 (100 $\mu\text{g/L}$) 的加标实验, 同时依据文献[11]中的报道, 通过手动 SPE 装置、全自动 SPE 装置流程进行尿液前处理, 以便进行比对。不同方法中目标化合物的回收率见表 2。结果表明, SLE 前处理方法中, 各目标化合物在 10、50 与 100 $\mu\text{g/L}$ 加标浓度下的回收率在 88.5% ~ 120.9% 之间, 相对标准偏差 < 6.7%; 手动 SPE 的回收率在 80.4% ~ 94.0% 之间, 自动 SPE 的回收率在 76.8% ~ 107.3% 之间。与手动 SPE、自动 SPE 相比, 本方法加标回收率更高, 稳定性也较好。

表 2 不同方法与加标浓度下目标化合物的回收率 ($n=6$)

Table 2 Recoveries and RSDs for OH-PAHs at three spiked levels by different methods ($n=6$)

化合物 Compound	回收率 Recovery \pm RSD (%)								
	加标水平 Spiked level at 10 $\mu\text{g/L}$			加标水平 Spiked level at 50 $\mu\text{g/L}$			加标水平 Spiked level at 100 $\mu\text{g/L}$		
	SLE	SPE	Auto-SPE	SLE	SPE	Auto-SPE	SLE	SPE	Auto-SPE
1-OHN	120.9 \pm 4.8	90.4 \pm 6.6	92.1 \pm 11.1	108.5 \pm 4.0	93.0 \pm 1.6	101.6 \pm 3.3	103.0 \pm 1.9	94.0 \pm 4.0	94.4 \pm 10.2
2-OHN	98.9 \pm 3.4	90.2 \pm 4.1	90.2 \pm 6.0	89.7 \pm 3.7	88.4 \pm 1.7	85.1 \pm 15.1	91.2 \pm 1.0	87.6 \pm 2.9	87.6 \pm 5.3
2+3-OHF ^a	99.3 \pm 1.7	86.7 \pm 1.5	100.2 \pm 18.0	99.5 \pm 6.7	92.6 \pm 1.8	106.9 \pm 12.8	98.4 \pm 1.6	88.8 \pm 3.1	102.1 \pm 10.0
2-OHPhe	98.4 \pm 2.7	87.4 \pm 2.1	98.0 \pm 9.7	106.1 \pm 1.6	84.3 \pm 1.8	101.8 \pm 15.7	104.6 \pm 2.4	82.6 \pm 4.2	90.0 \pm 7.2
3-OHPhe	98.3 \pm 1.7	90.9 \pm 1.1	98.0 \pm 9.7	101.9 \pm 3.6	88.3 \pm 2.9	101.8 \pm 15.7	103.1 \pm 1.8	88.1 \pm 3.5	90.0 \pm 7.2
1+9-OHPhe ^b	90.0 \pm 2.7	86.2 \pm 2.0	80.0 \pm 12.7	88.5 \pm 2.2	89.0 \pm 2.6	76.8 \pm 11.0	101.5 \pm 1.5	89.1 \pm 2.7	85.0 \pm 9.1
4-OHPhe	101.3 \pm 1.4	85.5 \pm 2.5	91.4 \pm 15.2	102.3 \pm 2.4	92.4 \pm 2.2	103.5 \pm 13.5	106.4 \pm 3.1	87.2 \pm 3.3	105.2 \pm 11.8
1-OHP	93.2 \pm 4.3	83.7 \pm 3.0	90.3 \pm 3.8	89.5 \pm 2.4	81.8 \pm 3.2	92.7 \pm 7.8	101.0 \pm 2.5	80.4 \pm 4.0	107.3 \pm 6.6

^a 3-OHF 与 2-OHF 共溢出; ^b 9-OHPhe 与 1-OHPhe 共溢出。

^a 3-OHF was co-eluted with 2-OHF; ^b 9-OHPhe was co-eluted with 1-OHPhe. SLE: solid-phase supported liquid-liquid extraction; SPE, solid phase extraction.

通过混合尿液基质加标与溶剂标样同时检测, 基质效应计算公式如下:

$$\text{ME}(\%) = \frac{\text{Area}_1 - \text{Area}_0 - \text{Area}_2}{\text{Area}_2} \times 100\% \quad (1)$$

其中, ME 为基质效应; Area_1 为混合基质加标后目标物检测的响应峰面积; Area_0 为混合基质中目标物检测的响应峰面积; Area_2 为溶剂标样中目标物检测的响应峰面积。ME < 0, 表示有基质抑制效应; ME > 0, 表示有基质促进效应; ME = 0, 表示无基质效应。结果表明 (表 3), SLE 各化合物的基质效应在 -21.3% ~ -4.1% 之间, 均呈现基质抑制效应, 但除了 2+3-OHF 与 1+9-OHPhe 外, 基质效应均较小。与手动 SPE 的 -44.2% ~ -21.6% 和自动 SPE 的 -74.9% ~ -39.1% 相比, 基质效应明显降低。引起 LC-MS/MS 中基质效应的内源性成分 (如盐、蛋白质、肽类和磷脂等) 在这些溶剂中不可溶。因此, 分析物被洗脱下来, 而基质仍保留在硅藻土吸附剂的水相中, 被有效地从最终萃取物中去除。

表 4 列出了所有分析物的回归方程、重复

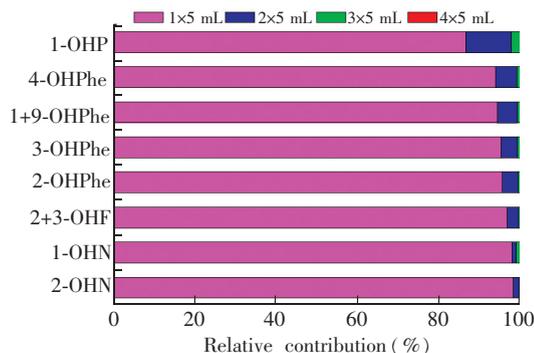


图 2 回收率与洗脱溶剂体积的关系

Fig. 2 Relationship between the recovery of OH-PAHs and the fraction of elution solvent

表 3 不同方法下目标化合物的基质效应

Table 3 Matrix effect (ME) for OH-PAHs by different methods

化合物 Compound	基质效应 ME (%)		
	SLE	SPE	Auto-SPE
1-OHN	-4.1	-27.6	-52.1
2-OHN	-4.9	-30.8	-61.3
2+3-OHF	-15.1	-33.5	-77.2
2-OHPhe	-6.7	-38.5	-57.8
3-OHPhe	-4.8	-33.2	-57.8
1+9-OHPhe	-21.3	-44.2	-74.9
4-OHPhe	-8.0	-23.1	-53.6
1-OHP	-4.5	-21.6	-39.1

性、检测限和定量限。各化合物都呈现了良好的线性,相关系数(R^2)均高于 0.993。检出限与定量限分别在 0.06 ~ 0.3 $\mu\text{g/L}$ 和 0.2 ~ 1.0 $\mu\text{g/L}$ 之间,各化合物的日内 ($n=6$) 偏差与日间 ($n=6$) 偏差在 1.6% ~ 8.1% 之间。OH-PAHs 标准物的总离子流图见图 3。

目前,用于 OH-PAHs 的检测方法主要有 HPLC、GC-MS 和 LC-MS/MS。方法的回收率和灵敏度除仪器自身的检测能力外,前处理过程也在很大程度上影响分析方法的回收率及灵敏度。Jongeneelen 等^[29]采用 SPE 对尿样中 1-OHP 进行富集,回收率仅为 78% \pm 2%,尿样基质干扰大。Campo 等^[12]用正己烷进行 LLE 萃取,在此基础上通过甲硅烷基化试剂进行衍生化,GC-MS 方法检测的 LOD 在 0.1 ~ 1.4 $\mu\text{g/L}$ 之间。Jacob 等^[14]采用戊烷-乙酸乙酯 (9:1, V/V) 混合溶剂萃取出尿液样品中的 OH-PAHs,随之将代谢物转化为五氟苄基醚衍生物后,利用 LC-MS/MS 进行检测,方法灵敏度高,LOD 可低至 0.01 ~ 0.50 $\mu\text{g/L}$ 。但这些方法需要进行分析物的衍生化,操作繁琐耗时,衍生化反应的稳定性要求较高。Fan 等^[13]建立了一种利用戊烷和甲苯的混合溶剂萃取 OH-PAHs 的方法,减少了基质干扰并显著提高了方法灵敏度,LOD 范围为 1.72 ~ 17.47 ng/L,但需要加入 AgNO_3 溶液以降低 PAH 硫化物的干扰,操作相对较为复杂,不适用于流行病学大队列的研究需求。本方法与文献报道的其它方法相比,不需要进行衍生化,操作简单快速,且检出限较低。

表 4 OH-PAHs 的线性回归方程、精密度、检测限和定量限

Table 4 Regression equations, repeatability, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of OH-PAHs

化合物 Compound	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (R^2)	精密度 Repeatability (%, $n=6$)		检出限 LOD ($\mu\text{g/L}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g/L}$)
				日内 Intra-day	日间 Inter-day		
2-OHN	2.5 ~ 250	$y=4 \times 10^{-6}x - 7.33$	0.9999	2.3	5.7	0.06	0.2
1-OHN	2.5 ~ 250	$y=1 \times 10^{-5}x - 1.95$	0.9998	2.8	7.3	0.1	0.3
2+3-OHF	3.5 ~ 175	$y=3 \times 10^{-6}x - 5.06$	0.9998	1.6	8.1	0.3	1.0
2+3-OHPhe	2.0 ~ 200	$y=3 \times 10^{-6}x - 4.00$	0.9998	1.6	6.6	0.08	0.3
1+9-OHPhe	2.0 ~ 200	$y=5 \times 10^{-6}x - 3.47$	0.9998	4.4	7.6	0.08	0.3
4-OHPhe	1.0 ~ 100	$y=5 \times 10^{-6}x - 1.57$	0.9996	5.9	7.2	0.06	0.2
1-OHP	1.0 ~ 100	$y=1 \times 10^{-5}x - 0.18$	0.9993	4.9	4.3	0.2	0.8

3.3 方法的实际应用

应用本方法对广东省某小学志愿者的 20 例尿样进行了检测。由表 5 可见,所有目标物均有检出,2-OHN 是最主要的检出化合物,最高浓度达到 4.83 $\mu\text{g/L}$ 。目标物的平均浓度分别为 2-OHN 1.16 $\mu\text{g/L}$ 、1-OHN 0.62 $\mu\text{g/L}$ 、2+3-OHF 0.21 $\mu\text{g/L}$ 、2-OHPhe 0.08 $\mu\text{g/L}$ 、3-OHPhe 0.11 $\mu\text{g/L}$ 、1+9-OHPhe 0.10 $\mu\text{g/L}$ 、4-OHPhe 0.02 $\mu\text{g/L}$ 和 1-OHP 0.15 $\mu\text{g/L}$ 。上述结果表明,本方法可用于人体尿液中 OH-PAHs 的检测。

4 结论

建立了 SLE 富集、净化人体尿液中多种 OH-PAHs,结合 LC-MS/MS 进行检测的方法。建立的前处理技术无需对 SLE 柱进行预活化,只需将 2 mL 尿液样品酶解后载入柱中,用 3 \times 5 mL 二氯甲烷和正己烷 (3:7, V/V) 的混合溶剂进行洗脱,方法简单、快速。与目前广泛使用的 SPE 等前处理技术相比,SLE 方法具有回收率高且稳定、生物基质干扰较小等显著优势,可满足人体尿液中 10 种 OH-PAHs 的分析需求。

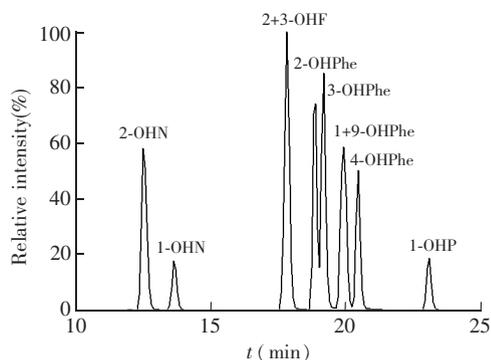


图 3 标准溶液中 OH-PAHs 的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatograms for OH-PAHs standards

表 5 20 例尿样中 OH-PAHs 的体积浓度值($\mu\text{g/L}$)Table 5 Determined concentrations of OH-PAHs in 20 urine samples ($\mu\text{g/L}$)

尿样 Urine sample	2-OHN	1-OHN	2+3-OHF	2-OHPhe	3-OHPhe	1+9-OHPhe	4-OHPhe	Total OH- Phes ^a	1-OHP	Total OH- PAHs ^b
S1	0.31	0.14	0.17	0.11	0.10	0.11	0.03	0.34	0.14	1.10
S2	1.69	2.38	0.40	0.19	0.56	0.49	0.10	1.33	0.71	6.51
S3	0.23	0.11	0.16	0.06	0.08	0.09	0.03	0.25	0.04	0.78
S4	1.03	0.57	0.11	0.06	0.05	0.06	0.03	0.20	0.04	1.95
S5	0.54	0.38	0.12	0.06	0.07	0.08	0.03	0.24	0.05	1.32
S6	1.62	0.29	0.12	0.06	0.08	0.11	0.07	0.33	0.05	2.42
S7	1.38	1.09	0.19	0.08	0.10	0.18	0.04	0.40	0.20	3.26
S8	1.12	0.87	0.23	0.11	0.13	0.17	0.04	0.44	0.15	2.81
S9	1.63	0.52	0.24	0.07	0.08	0.14	0.03	0.31	0.09	2.79
S10	0.40	0.18	0.13	0.06	0.07	0.07	0.03	0.22	0.07	1.01
S11	1.67	0.50	0.19	0.06	0.08	0.12	0.03	0.29	0.08	2.73
S12	0.24	0.20	0.28	0.07	0.10	0.08	0.02	0.27	0.02	1.02
S13	0.21	0.07	0.14	0.05	0.06	0.09	0.02	0.23	0.04	0.68
S14	0.29	0.50	0.15	0.07	0.07	0.16	0.03	0.33	0.09	1.36
S15	0.88	0.46	0.19	0.06	0.08	0.10	0.03	0.27	0.07	1.86
S16	0.41	0.48	0.29	0.08	0.08	0.13	0.05	0.33	0.11	1.63
S17	0.88	0.38	0.26	0.09	0.17	0.16	0.03	0.44	0.25	2.22
S18	4.83	0.38	0.15	0.09	0.06	0.10	0.03	0.27	0.06	5.69
S19	2.71	2.81	0.30	0.07	0.16	0.23	0.05	0.51	0.15	6.48
S20	1.05	0.06	0.39	0.10	0.13	0.17	0.04	0.44	0.10	2.03
Mean	1.16	0.62	0.21	0.08	0.11	0.10	0.02	0.24	0.15	1.78

^a Total OH-Phes: OH-Phes 的总浓度; ^bTotal OH-PAHs: 10 种 OH-PAHs 的总浓度。

^a Total OH-Phes: total concentration of OH-Phes. ^bTotal OH-PAHs: total concentration of 10 OH-PAHs.

References

- Campo L, Mercadante R, Rossella F, Fustinoni S. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 631(2): 196–205
- U. S. Department of Health & Human Services, Public Health Service. *J. Toxicol. -Cutan. Ocul.*, **1999**, 18(2): 141–147
- Yang B C, Fang S F, Wan X J, Luo Y, Zhou J Y, Li Y, Li Y J, Wang F, Huang O P. *Anal. Chim. Acta*, **2017**, 973: 68–74
- Strickland P, Kang D H. *Toxicol. Lett.*, **1999**, 108(2-3): 191–199
- Li Z, Sandau C D, Romanoff L C, Caudill S P, Sjodin A, Needham L L, Patterson D G. *Environ. Res.*, **2008**, 107(3): 320–331
- FU Hui, HU Xiao-Jian, CHEN Xi, LIN Shao-Bin. *Chinese Journal of Chromatography*, **2018**, 36(5): 487–492
付慧, 胡小键, 陈曦, 林少彬. *色谱*, **2018**, 36(5): 487–492
- Fan R F, Wang D L, Ramage R, She J W. *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, 25(2): 491–499
- Zheng J H, Zheng W W, Zhou Y, Jiang S H, Spencer P, Ye W M, Zheng Y X, He G S, Qu W D. *Environ. Sci. Technol.*, **2018**, 52(15): 8866–8875
- Onyemauwa F, Rappaport S M, Sobus J R, Gajdosová D, Wu R, Waidyanatha S. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877(11-12): 1117–1125
- Smith C J, Huang W, Walcott C J, Turner W, Grainger J, Patterson D. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 372(1): 216–220
- Yue Q, Wang D C, Yu Z Q. *J. Environ. Health*, **2009**, 26(5): 385–387
- Campo L, Rossella F, Fustinoni S. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 875(2): 531–540
- Fan R, Ramage R, Wang D, Zhou J, She J. *Talanta*, **2012**, 93(11): 383–391
- Jacob P, Wilson M, Benowitz N L. *Anal. Chem.*, **2007**, 79(2): 587–598
- Woudneh M B, Benskin J P, Grace R, Hamilton M C, Magee B H, Hoeger G C, Forsberg N D, Cosgrove J R. *J. Chromatogr. A*, **2016**, 1454: 93–100
- Li Z, Romanoff L C, Trinidad D A, Hussain N, Jones R S, Porter E N, Patterson D G, Sjodin A. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(16): 5744–5751

- 17 Lin Y, Qiu X H, Yu N, Yang Q Y, Araujo J A, Zhu Y F. *Environ. Sci. Technol.*, **2016**, 50(7): 3738–3745
- 18 Breitenbucher J G, Arienti K L, McClure K J. *J. Comb. Chem.*, **2001**, 3(6): 528–533
- 19 Majors R E. *LC GC Eur.*, **2012**, 25(8): 430–435
- 20 Ding X, Li F, Mcknight J, Schmidt C, Strooisma K, Shimizu H, Faber K, Ware J A, Dean B. *J. Pharmaceut. Biomed.*, **2014**, 100: 150–156
- 21 Sauve E N, Langodegard M, Ekeberg D, Oiestad A M L. *J. Chromatogr. B*, **2012**, 883: 177–188
- 22 Ding X, Chen Y, Sahasranaman S, Shi Y F, Mcknight J, Dean B. *Biomed. Chromatogr.*, **2016**, 30(12): 1984–1991
- 23 Liu H T, Huang L P, Chen Y X, Guo L M, Li L M, Zhou H Y, Luan T G. *J. Chromatogr. B*, **2015**, 992: 96–102
- 24 Kristoffersen L, Langodegard M, Gaare K I, Amundsen I, Terland M N, Strand D H. *J. Chromatogr. B*, **2018**, 1093: 8–23
- 25 Valen A, Oiestad A M L, Strand D H, Skari R, Berg T. *Drug Test Anal.*, **2017**, 9(5): 808–823
- 26 Rositano J, Harpas P, Kostakis C, Scott T. *Forensic Sci. Int.*, **2016**, 265: 125–130
- 27 Hinchliffe E, Rudge J, Reed P. *Ann. Clin. Biochem.*, **2016**, 53(4): 434–445
- 28 Meunier C, Blondelle D, Faure P, Baguet J P, Le Goff C, Chabre O, Ducros V. *Clin. Chim. Acta*, **2015**, 447: 8–15
- 29 Jongeneelen F J, Anzion R B M, Henderson P T. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, **1987**, 413: 227–232

Determination of 10 Kinds of Monohydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Urine by Supported Liquid Extraction Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SHANG Ting^{1,2}, ZHAO Ling-Juan¹, LI Pei^{1,2}, ZENG Xiang-Ying¹, YU Zhi-Qiang^{*1}

¹(State Key Laboratory of Organic Geochemistry, Guangdong Key Laboratory of Environment and Resources, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract The monitoring of urinary monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs) can be used for the risk assessment of human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). In this work, we developed and optimized a new pretreatment method based on solid-phase supported liquid-liquid extraction (SLE). After pretreatment, the analytes were then determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Urine samples were extracted with a mixed solution of dichloromethane and *n*-hexane (3:7, V/V) by a SLE clean-up using a diatomaceous earth mini-cartridge. The results indicated that the developed pretreated procedure had good recoveries and also significantly reduced the interference of biological matrix. At three concentration levels (10, 50 and 100 µg/L), the recoveries of ten OH-PAHs ranged from 88.5% to 120.9%, and the repeatability ranged from 1.6% to 8.1%. The limits of detection ranged from 0.06 µg/L to 0.3 µg/L and the limits of quantitation were between 0.2 µg/L and 1.0 µg/L. This method was finally successfully applied to the determination of OH-PAHs in urines collected from primary school students in Guangdong. The results showed that 2-OHN was the dominant compound, with the highest concentration of 4.83 µg/L.

Keywords Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons; Urine; Supported liquid extraction; Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(Received 30 January 2019; accepted 6 April 2019)

This work was supported by the "Strategic Priority Research Program" of the Chinese Academy of Sciences (No. XDB14010202), and the National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFC0212003).