2025 年 6 月 色 谱 Vol.43 No.6
June 2025 Chinese Journal of Chromatography 640~649

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2024.04002

超高效液相色谱-串联质谱同时测定尿液中10种邻苯二甲酸酯代谢物

赵小英[1]，康 慧[2]，王燕燕[1]，李文慧[3]，陈 铭[3]，可 婵[1]，秦 峰[1*]，康熙雄[2*]

（1. 沈阳药科大学分析化学实验室，辽宁 沈阳 110000；2. 北京中检体外诊断工程技术研究中心，北京 100095；3. 裕菁科技（上海）有限公司，上海 200120）

摘要：建立了超高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）同时测定人尿液中10种邻苯二甲酸酯（PAEs）代谢物的方法，并将该方法应用于人体内PAEs代谢物的暴露水平评估。采用固相萃取技术对尿液中的10种PAEs代谢物进行前处理，使用ACQUITY UPLC BEH Phenyl色谱柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）分离，以0.1%甲酸水和0.1%甲酸乙腈为流动相进行梯度洗脱，流速为0.5 mL/min，柱温为40 ℃，进样量为20 μL。在电喷雾电离（ESI）源负离子模式下进行检测，多反应监测模式采集数据，同位素内标法定量。方法学验证结果表明，该方法的专属性高，10种PAEs代谢物在各自的线性范围内线性关系良好，检出限（LOD）为0.03~0.3 ng/mL，定量限（LOQ）为0.1~1 ng/mL；在4个质控水平下，10种PAEs代谢物的日内和日间精密度均≤8.3%，准确度（用相对误差表示）为−10.5%~7.3%。将该方法应用于评估60名志愿者尿液中PAEs代谢物的暴露水平，每名志愿者的尿液中均可检出1~6种PAEs代谢物。该方法灵敏准确，简便高效，适用于PAEs代谢物的大规模生物监测。

关键词：超高效液相色谱-串联质谱；邻苯二甲酸酯代谢物；尿液样品；塑化剂

中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Simultaneous determination of 10 phthalate metabolites in urine by ultra performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry

ZHAO Xiaoying[1], KANG Hui[2], WANG Yanyan[1], LI Wenhui[3], CHEN Ming[3], KE Chan[1], QIN Feng[1*], KANG Xixiong[2*]

(*1. Analytical Chemistry Laboratory, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110000, China; 2. Beijing Zhongjian IVD Engineering Research Center, Beijing 100095, China; 3. Yujing Technology Shanghai Co., Ltd., Shanghai 200120, China*)

Abstract: Phthalates (PAEs) are widely employed as plasticizers in plastic products that are used in industrial, agricultural, food, medical, and other fields. PAEs are relatively weakly bonded to plastic products through non-covalent interactions. Consequently, PAEs can easily leak from the product into the environment, which exposes the public to PAEs through food intake, skin absorption from personal care products, and by inhaling air. Related studies have shown that PAEs are endocrine-disrupting substances and that long-term exposure to PAEs may result in diseases of the nervous, reproductive, cardiovascular and immune systems. In addition, excessive exposure to PAEs may trigger inflammatory responses and induce tumors. Therefore, establishing a highly sensitive assay for determining PAE levels in the human body following exposure is an important

收稿日期：2024-04-01

* **通讯联系人**. E-mail：qf-1998@163.com（秦峰）；E-mail：kangxx@vip.sina.com（康熙雄）.

基金项目：国家重点研发计划（2022YFC2009600，2022YFC2009603）.

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (Nos. 2022YFC2009600, 2022YFC2009603).

objective. PAEs generally have half-lives of less than 24 h; they are rapidly metabolized through enzymatic hydrolysis after entering the human body and excreted through urine. Therefore, most studies have focused on PAE metabolites as target compounds; hence, human body exposure to PAEs can be assessed by analyzing the types and levels of these metabolites. Herein, we established a method for simultaneously determining ten phthalate (PAE) metabolites in human urine using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The ten PAE metabolites in urine were separated using an ACQUITY UPLC BEH Phenyl column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm). Gradient elution was performed using 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid in acetonitrile as the mobile phases, at a flow rate of 0.5 mL/min, a column temperature of 40 ℃, and a sample size of 20 μL. Data were acquired in negative-ion electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) modes, and quantified using the isotope internal standard method. The method was found to be highly specific, with the ten PAE metabolites exhibiting good linearities in their linear ranges, with limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) of 0.03-0.3 and 0.1-1 ng/mL, respectively. Under the four quality control (QC) levels, the intra-day and inter-day precisions of the ten PAE metabolites were all ≤8.3%, and the accuracy ranged from -10.5% to 7.3%. The method was used to assess the exposure levels of PAE metabolites in the urine samples of 60 volunteers, with 1-6 kinds of PAE metabolites detected in the urine of each volunteer. This method is sensitive, accurate, simple, efficient, and suitable for the large-scale biological monitoring of PAE metabolites.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); phthalate metabolites; urine samples; plasticizer

邻苯二甲酸酯(phthalates，PAEs)是塑料制品中普遍使用的塑化剂，它们广泛存在于工业、农业、食品、医药等多个领域的产品中，如塑料地板、塑料薄膜、食品包装、血袋、玩具、化妆品和口罩等[1-3]。PAEs 与塑料制品之间通过非共价键结合，这种相互作用相对较弱，因此 PAEs 容易从产品中游离出来进入环境[4]。人群主要通过食物摄入[5]、个人护理产品的皮肤吸收[6]以及空气吸入[7]等途径暴露于 PAEs。相关研究表明，PAEs 是一种内分泌干扰物质，长期暴露于 PAEs 可能引发神经系统、生殖系统、心血管系统和免疫系统的疾病[8]。儿童通常是 PAEs 的高暴露风险群体[9]，性早熟、注意力缺陷多动障碍以及肥胖等问题与他们的 PAEs 暴露密切相关[10]。流行病学研究还指出，PAEs 暴露与男性生殖器官异常、女性不孕以及子宫内膜异位症等疾病之间存在正相关关系[11,12]。此外，过度接触 PAEs 还可能引发炎症反应，甚至诱发肿瘤[13,14]。尽管塑化剂的使用受到法规限制，但其使用量仍然相当可观。在大气、室内灰尘、水源以及土壤中均可检测到高水平的 PAEs[15-18]。自 20 世纪 90 年代以来，美国、德国、加拿大等国家已将 PAEs 列为重点监测的有害化合物之一，并实施了全面且长期的生物监测计划[19,20]。相比之下，国内的相关报道较少，直到 2017 年才出现具有全国代表性的前瞻性队列研究[21]。

目前，相较于血浆、乳液、精液、羊水和唾液等生物基质，尿液是研究 PAEs 暴露的首选基质。尿液的非侵入性采集方式简便、快捷，且便于运输，这种无创采样方式也更易于受试者接受。然而，PAEs 的半衰期通常不超过 24 h，PAEs 在进入人体后可迅速通过酶水解作用进行代谢，并通过尿液排出，这导致其在尿液中的含量低于其代谢产物的含量。

引用本文：赵小英，康慧，王燕燕，李文慧，陈铭，可婵，秦峰，康熙雄. 超高效液相色谱-串联质谱同时测定尿液中10种邻苯二甲酸酯代谢物. 色谱，2025，43(6)：640-649.

ZHAO Xiaoying, KANG Hui, WANG Yanyan, LI Wenhui, CHEN Ming, KE Chan, QIN Feng, KANG Xixiong. Simultaneous determination of 10 phthalate metabolites in urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(6): 640-649.

此外，若将 PAEs 本身作为目标化合物进行研究，在样品运输和实验操作过程中，很难避免由于接触塑料尿杯、离心管等容器而引入的污染。因此，当前研究大多以 PAEs 代谢物为目标化合物，这些代谢产物与 PAEs 在人体内的代谢过程紧密相关。通过分析尿液中 PAEs 代谢物的种类和水平，可以评估人体对 PAEs 的暴露程度。

为准确测定 PAEs 代谢物的含量，建立高效、可靠的分析方法是关键前提。为了减少生物基质干扰，需在测定前进行样品前处理操作。当前，液液萃取和固相萃取是主要的 PAEs 代谢物前处理方法。液液萃取的成本虽低，但有机试剂用量大、味道刺激，且易导致样品乳化、净化效果差，需额外的净化步骤。相比之下，固相萃取方法具有回收率高、净化效果好、有机试剂消耗少及操作简便等优势。常见的固相萃取柱有 C_{18} 固相萃取柱、亲水-亲酯平衡（hydrophile-lipophile balance，HLB）柱、混合型阴离子交换（mixed-mode anionic-exchanger，MAX）固相萃取柱等。MAX 固相萃取柱兼具强阴离子交换和反相保留功能，可同时有效净化极性较强的单酯代谢物和极性较弱的长链次级代谢物。与其他固相萃取柱相比，MAX 固相萃取柱更有助于提高 PAEs 代谢物的净化效率和回收率。

PAEs 代谢物的测定方法主要有气相色谱-质谱法（GC-MS）[22-24]、气相色谱-串联质谱法（GC-MS/MS）[25]、液相色谱-质谱法（LC-MS）[26]和液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）[27]等。其中，GC 需进行衍生化处理，其前处理步骤繁琐且耗时。文献[28-30]中报道的液相色谱-质谱联用技术，通常只能分析不超过 5 种 PAEs 代谢物，且分析时长均超过 10 min。Kato 等[29]利用在线固相萃取-LC-MS/MS 技术，测定了 3 种 PAEs 代谢物，但该方法对实验室仪器条件要求较高，仪器参数难以在不同实验室间通用。Myridakis 等[30]和高慧等[31]建立的方法均能够同时测定 7 种 PAEs 代谢物，张续等[32]建立的方法则能同时测定 9 种 PAEs 代谢物，然而这些方法的分析时间至少需要 23 min，不利于实现 PAEs 代谢物的高通量检测。

基于上述问题，本研究将固相萃取与 UPLC-MS/MS 结合，建立了可同时测定尿液中 10 种 PAEs 代谢物的高灵敏度方法。该方法简便、快速，适用于评估大规模人群中 PAEs 的暴露水平，并能够为筛选和鉴定 PAEs 暴露的生物标志物提供参考，进而助力全面评估 PAEs 对人体健康的影响。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY I-Class 超高效液相色谱仪、Xevo TQ-S 质谱仪（美国 Waters 公司）；Master-D 超纯水仪（上海和泰仪器有限公司）；5430R 冷冻型离心机（德国 Eppendorf 公司）；KH-200SP 超声波清洗机（昆山禾创超声仪器有限公司）；IKA MS 3 digital 圆周振荡器（广州艾卡仪器设备有限公司）；Secura 125-1CN 分析天平（上海赛多利斯贸易有限公司）。

10 种 PAEs 代谢物标准品和同位素内标均购自加拿大 TRC 公司。10 种 PAEs 代谢物：邻苯二甲酸单甲酯（MMP，纯度 98%）、邻苯二甲酸单乙酯（MEP，纯度 98%）、邻苯二甲酸单苯酯（MBzP，纯度 98%）、邻苯二甲酸单正丁酯（MnBP，纯度 98%）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-氧代己基）酯（MEOHP，纯度 97%）、邻苯二甲酸单正辛酯（MnOP，纯度 97%）、邻苯二甲酸单异丁酯（MiBP，纯度 98%）、邻苯二甲酸单正戊酯（MPP，纯度 98%）、邻苯二甲酸单环己酯（MCHP，纯度 98%）和环己二甲酸单（4-甲基-7-羧庚基）酯（cx-MINCH，纯度 96%），结构式见图 1。10 种同位素内标：MMP-d4（纯度 98%）、MEP-d4（纯度 98%）、MBzP-d4（纯度 96%）、MnBP-d4（纯度 97%）、MEOHP-d4（纯度 97%）、MnOP-d4（纯度 96%）、MiBP-d4（纯度 98%）、MPP-d4（纯度 98%）、MCHP-d4（纯度 98%）、cx-MINCH-d8（纯度 96%）。甲酸（LC-MS 级，上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；甲醇、乙腈、乙酸铵（LC-MS 级，上海安谱实验科技股份有限公司）；β-葡萄糖醛酸酶（无锡微色谱生物科技有限公司）；25% 氨水（国药集团化学试剂有限公司）。实验中用到的所有超纯水均由 Master touch-D 超纯水仪制备。Purphy MAX 96 孔固相萃取板购自裕菁科技（上海）有限公司。

本研究已得到重庆大学附属肿瘤医院伦理委员会的批准（批准文件号：CZLS2022098-A）。尿液采集于表观健康志愿者，且每位志愿者均在试验前签署了知情同意书。

1.2 溶液的配制

1.2.1 混合标准溶液和质控工作溶液的配制

精密称取各标准品适量，用甲醇溶解、定容，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。精密吸取适量的各标准储备溶液于同一容量瓶中，用甲

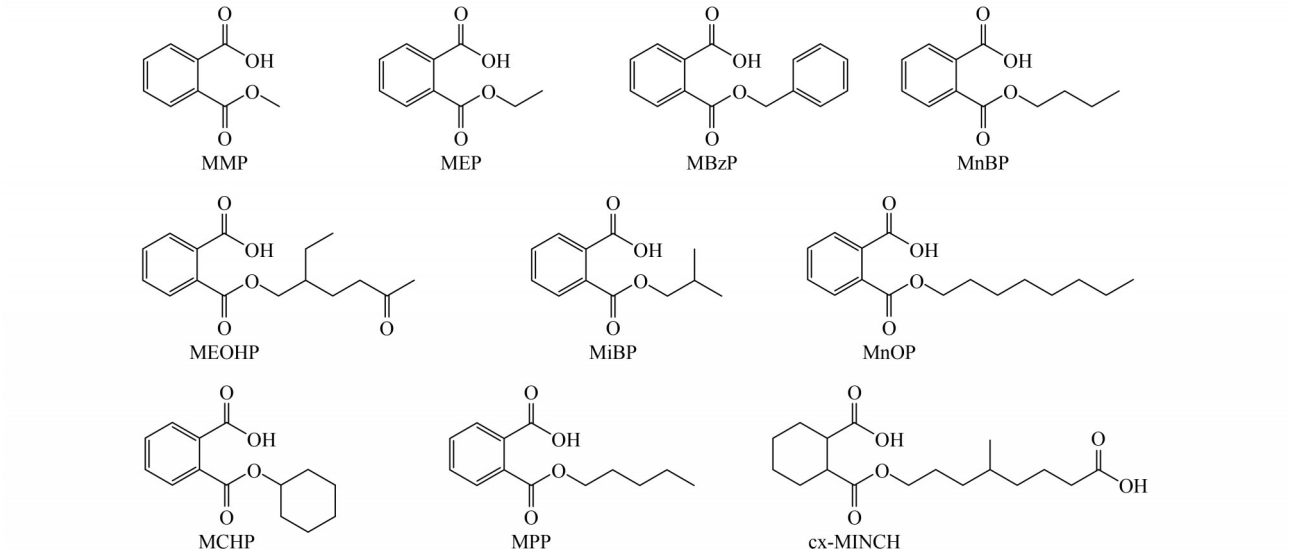


图1　10种PAEs代谢物的结构式

Fig. 1　Structural formulas of the 10 phthalate (PAE) metabolites

MMP: mono-methyl phthalate; MEP: mono-ethyl phthalate; MBzP: mono-benzyl phthalate; MnBP: mono-*n*-butyl phthalate; MEOHP: mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate; MiBP: mono-iso-butyl phthalate; MnOP: mono-*n*-octyl phthalate; MCHP: mono-cyclohexyl phthalate; MPP: mono-*n*-pentyl phthalate; cx-MINCH: cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-carboxyisononyl ester.

醇定容，配制成混合储备溶液，其中 MMP、MEP、MBzP、MnBP、MnOP 和 MiBP 的质量浓度为 100 μg/mL，MEOHP、MPP、MCHP 和 cx-MINCH 的质量浓度为 20 μg/mL。用 20% 甲醇水溶液对混合储备溶液进行逐级稀释，配制成系列质量浓度的混合标准溶液，其中 MMP、MEP、MBzP、MnBP、MnOP 和 MiBP 的系列质量浓度为 0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、10 μg/mL，MEOHP、MPP、MCHP 和 cx-MINCH 的系列质量浓度为 0.01、0.02、0.1、0.2、0.5、1、2 μg/mL。随后将配制好的混合标准溶液转移至棕色玻璃瓶中，并于−80 ℃保存。

采用相同的方法配制各质控储备溶液，混合后用 20% 甲醇水进行稀释，配制成 4 个不同水平（定量下限（LLOQ）、低水平质控（LQC）、中水平质控（MQC）和高水平质控（HQC））的质控工作溶液，并储存在棕色玻璃瓶中，−80 ℃下保存。其中，MMP、MEP、MBzP、MnBP、MnOP、MiBP 等 6 种 PAEs 代谢物的 LLOQ、LQC、MQC 和 HQC 分别为 0.05、0.15、2、8 μg/mL；MEOHP、MPP、MCHP、cx-MINCH 等 4 种 PAEs 代谢物的 LLOQ、LQC、MQC 和 HQC 分别 0.01、0.03、0.4、1.6 μg/mL。

1.2.2　混合内标工作溶液的配制

精密称取各内标标准品适量，用甲醇溶解、定容，制备内标储备溶液，其中 MMP-d4 的质量浓度为 1 000 μg/mL，MEP-d4、MBzP-d4、MnBP-d4、MnOP-d4、MiBP-d4、MPP-d4、MCHP-d4 的质量浓度为 500 μg/mL，MEOHP-d4、cx-MINCH-d8 的质量浓度为 100 μg/mL。用乙酸铵溶液对上述内标储备溶液进行混合稀释，制备混合内标工作溶液，其中 MMP-d4、MEP-d4、MBzP-d4、MnBP-d4、MnOP-d4、MiBP-d4 的质量浓度为 240 ng/mL，MEOHP-d4、MPP-d4、MCHP-d4、cx-MINCH-d8 的质量浓度为 48 ng/mL。将配制好的混合内标工作溶液储存在棕色玻璃瓶中，并在−80 ℃下保存。

1.2.3　基质匹配混合标准溶液和基质匹配质控溶液的配制

取 11 份 900 μL 空白人工尿液于 1.5 mL 试管中（编号 1~11），向编号为 1~7 的试管中分别加入 1.2.1 节系列质量浓度的混合标准溶液（各 100 μL），制得 10 种 PAEs 代谢物的基质匹配混合标准溶液；向编号为 8~11 的试管中分别加入 1.2.1 节 4 个水平的质控工作溶液（各 100 μL），制得 10 种 PAEs 代谢物的基质匹配质控溶液。

1.3　样品前处理

精密吸取 200 μL 待测尿液样品于 2 mL 离心管中，分别加入 50 μL 混合内标工作溶液和 10 μL *β*-葡萄糖醛酸酶溶液，于室温下涡旋混匀 1 min，并在 55 ℃下酶解 1 h；待冷却至室温后，加入 100 μL 25% 氨水，涡旋混匀 1 min，于 4 ℃、14 000 r/min 下离心 3 min，取出上清液，待用。依次用 200 μL 乙

腈和 200 μL 超纯水活化并平衡 Purphy MAX 96 孔固相萃取板；吸取 300 μL 样品上清液，上样于活化后的固相萃取板中，随后依次用 200 μL 超纯水和 200 μL 乙腈进行淋洗；更换新的收集板，向固相萃取板中加入 50 μL 2% 甲酸乙腈溶液进行洗脱，最后向收集板中加入 150 μL 超纯水，涡旋振荡 1 min 后，进样分析。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Phenyl 柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）；流动相：A 为 0.1% 甲酸水，B 为 0.1% 甲酸乙腈；流速：0.5 mL/min；进样量：20 μL；柱温：40 ℃；进样室温度：4 ℃。梯度洗脱程序：0~0.5 min，80% A；0.5~2.5 min，80% A~70% A，2.5~4.0 min，70% A~30% A；4.0~5.0 min，30% A~5% A；5.0~6.0，5% A~80% A。

1.4.2 质谱条件

离子源：电喷雾电离（ESI）源，负离子扫描；数据采集模式：多反应监测（MRM）模式；离子源温度：150 ℃；脱溶剂气温度：550 ℃；毛细管电压：2 kV；脱溶剂气流量：1 100 L/h；锥孔气流量：150 L/h；保留时间和其他质谱参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 UPLC-MS/MS 条件优化

为了提高色谱峰的分离效果和目标化合物的检测灵敏度，需筛选合适的色谱柱和流动相。实验分别考察了 ACQUITY UPLC BEH C_8（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）、ACQUITY UPLC HSS T_3（50 mm×2.1 mm，1.8 μm）和 ACQUITY UPLC BEH Phenyl（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）3 种色谱柱对目标化合物分离效果的影响。结果表明，10 种目标化合物在 Phenyl 柱上的分离效果最好，在 6 min 内即可实现有效分离且峰形良好。因此，选择 Phenyl 柱作为分离柱。

实验分别考察了甲醇和乙腈作为流动相有机相时的色谱分离效果。结果表明，当使用甲醇作为有机相时，目标化合物未能得到有效分离，而改用乙腈作为有机相时，色谱峰之间的分离度得到了明显改善。因此，选择乙腈作为流动相的有机相。为了改善色谱峰形，实验进一步考察了水-乙腈、0.1% 甲酸水-乙腈和 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈作为流动相时目标化合物的分离效果。实验结果表明，在 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈流动相条件下，10 种目标化合物的色谱峰无拖尾现象，且响应强度更高。分析其原因，PAEs 代谢物是弱酸性物质，在添加甲酸后可能增强了其在反相色谱柱上的保留能力。因此，实验最终选择 0.1% 甲酸水和 0.1% 甲酸乙腈作为流动相。

表 1 10 种 PAEs 代谢物及其同位素内标的保留时间和质谱参数

Table 1 Retention times and MS parameters of the 10 PAE metabolites and their isotope internal standards

Compound	t_R/min	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	CV/V	CE/V
MMP	0.90	178.9	107.0*, 77.0	20	10, 16
MEP	1.32	193.0	77.1*, 121.1	32	14, 12
MiBP	2.76	221.0	134.1*, 77.1	42	10, 15
MnBP	2.87	221.0	71.0*, 149.1	20	14, 10
MEOHP	3.04	291.1	143.1*, 121.1	20	12, 20
MBzP	3.23	255.0	77.1*, 104.6	22	18, 16
MCHP	3.34	247.1	97.1*, 77.1	12	14, 21
MPP	3.41	235.0	85.1*, 77.1	22	14, 18
cx-MINCH	3.45	327.1	173.1*, 153	42	16, 24
MnOP	4.04	277.1	127.1*, 77.1	20	14, 19
MMP-d4	0.88	183.0	81.0	30	16
MEP-d4	1.31	197.1	81.1	18	14
MiBP-d4	2.75	225.1	138.1	20	14
MnBP-d4	2.85	225.1	81.1	24	20
MEOHP-d4	3.02	295.1	143.1	20	12
MBzP-d4	3.21	259.1	187.1	36	12
MCHP-d4	3.32	251.0	97.0	20	14
MPP-d4	3.40	239.1	81.1	20	16
cx-MINCH-d8	3.44	335.1	173.1	16	14
MnOP-d4	4.02	281.1	127.1	20	18

RT：retention time；CV：cone voltage；CE：collision energy；* quantitative ion.

PAEs 代谢物属于极性较大的化合物，因此选择 ESI^- 模式进行离子化，并在 MRM 模式下采集数据。在此基础上，我们进一步优化了质谱参数，包括锥孔电压（CV）、碰撞能量（CE）、离子源温度、脱溶剂气温度以及脱溶剂气流量等，以提升各目标化合物的离子化效率，并最终确定了最优的质谱条件（见表 1）。在最佳仪器分析条件下，10 种 PAEs 代谢物的色谱图如图 2 所示。

2.2 稳定性考察

按 1.2.3 节步骤，制备两个水平（LQC 和 HQC）的基质匹配质控样本，并对这两个样本进行了以下稳定性的考察：（1）在室温下放置 5 h 后进行前处

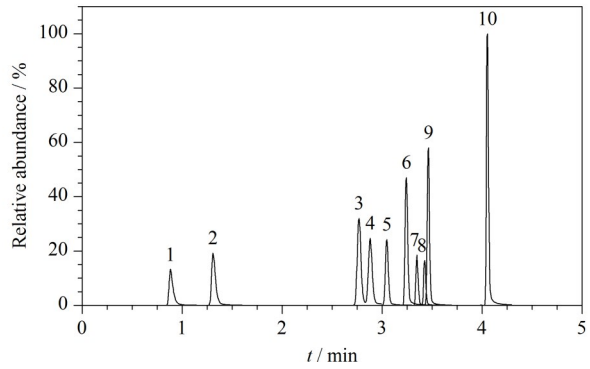


图2　10种PAEs代谢物的MRM色谱图

Fig. 2　MRM chromatogram of the 10 PAE metabolites

Peak identifications: 1. MMP; 2. MEP; 3. MiBP; 4. MnBP; 5. MEOHP; 6. MBzP; 7. MCHP; 8. MPP; 9. cx-MINCH; 10. MnOP.

理；(2)经历 3 次冻融循环后进行前处理；(3)−80 ℃下冷冻保存 20 d 后进行前处理；(4)采样后直接进行前处理，之后在 4 ℃的进样器中放置 24 h。每个考察条件下的样本平行制备 6 份，按 1.4 节条件进样分析，计算相对误差(RE=(目标物含量测定值−目标物含量理论值)/目标物含量理论值)。实验结果表明，在室温下放置 5 h 后，10 种 PAEs 代谢物含量的 RE 为−7.6%~8.4%；在经过 3 次冻融循环后，10 种 PAEs 代谢物含量的 RE 为−8.3%~6.4%；在−80 ℃下冷冻保存 20 d 后，10 种 PAEs 代谢物含量的 RE 为−9.5%~0.8%；经前处理并在进样器(4 ℃)中放置 24 h 后，10 种 PAEs 代谢物含量的 RE 为−6.8%~11.3%。实验结果表明，在上述处理条件下，10 种 PAEs 代谢物均能够保持良好的稳定性。

2.3　方法学验证

2.3.1　专属性

取 200 μL 空白人工尿液，按 1.3 节步骤进行样品前处理，其中混合内标工作溶液用乙酸铵溶液代替，得到不含内标和目标化合物的双空白样本。按 1.4 节条件进样分析，所得到的色谱图见附图 1 (www.chrom-China.com)。用 200 μL 空白人工尿液配制 LLOQ 水平的基质匹配质控样本，按 1.3 节步骤进行样品前处理，按 1.4 节条件进样分析，所得到的色谱图见附图 2。实验结果说明，尿液基质不会干扰目标化合物的检测，说明本方法的专属性较高。

2.3.2　线性范围、检出限与定量限

按 1.2.3 节方法配制系列质量浓度的基质匹配混合标准溶液，其中 MMP、MEP、MBzP、MnBP、MnOP 和 MiBP 等 6 种 PAEs 代谢物的系列质量浓度分别为 5、10、50、100、250、500、1000 ng/mL(相应的内标质量浓度为 240 ng/mL)，MEOHP、MPP、MCHP、cx-MINCH 等 4 种 PAEs 代谢物的系列质量浓度分别为 1、2、10、20、50、100、200 ng/mL(相应的内标质量浓度为 48.0 ng/mL)，按照 1.4 节条件进样分析。以目标化合物的质量浓度为横坐标(x，ng/mL)，目标化合物与对应内标的定量离子峰面积之比为纵坐标(y)，采用加权(权重系数为$(1/x^2)$)最小二乘法绘制标准曲线，并计算回归方程。结果如表 2 所示，MMP、MEP、MBzP、MnBP、MnOP 和 MiBP 在 5~1000 ng/mL 范围内线性关系良好，MEOHP、MPP、MCHP 和 cx-MINCH 在 1~200 ng/mL 范围内线性关系良好，相关系数(r^2)均≥0.997 1。以 3 倍信噪比计算检出限(LOD)、10 倍信噪比计算定量限(LOQ)，10 种 PAEs 代谢物的 LOD 为 0.03~0.3 ng/mL，LOQ 为 0.1~1 ng/mL。

表 2　10种PAEs代谢物的回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2　Regression equations, correlation coefficients (r^2), LODs, and LOQs of the 10 PAE metabolites

Compound	Regression equation	r^2	LOD/(ng/mL)	LOQ/(ng/mL)
MMP	y=0.016x+0.0074	0.9996	0.3	1
MEP	y=0.0195x+0.0051	0.9979	0.2	0.5
MiBP	y=0.0097x+0.005	0.9980	0.3	1
MnBP	y=0.0091x+0.011	0.9971	0.3	1
MEOHP	y=0.0485x+0.0017	0.9999	0.03	0.1
MBzP	y=0.0078x+0.0008	0.9995	0.03	0.1
MCHP	y=0.1153x−0.0083	0.9989	0.03	0.1
MPP	y=0.093x+0.0028	0.9987	0.2	0.5
cx-MINCH	y=0.0935x−0.0036	0.9995	0.03	0.1
MnOP	y=0.0155x−0.0026	0.9989	0.03	0.1

y: peak area ratio of the target compound to the corresponding interal standard; x: mass concentration, ng/mL.

2.3.3　残留考察

按 1.2.3 节和 2.3.1 节，分别配制系列质量浓度的基质匹配混合标准溶液和不含内标及目标化合物的双空白样本，按 1.3 节方法进行前处理。随后，从最低质量浓度开始，依次进样系列质量浓度的基质匹配混合标准溶液，在最高质量浓度的溶液进样完成后，立即采集一针双空白样本。结果表明，在双空白样本中，各目标化合物的峰面积占最低质量浓度样本中对应目标化合物峰面积的 0~17.3%，均不超过最低质量浓度样本峰面积的 20%；同时，双空白样本中各内标的峰面积占最低质量浓度样本中

对应内标峰面积的 0~0.06%，均不超过最低质量浓度样本内标峰面积的 5%。这一实验结果说明，在进样高质量浓度样本后，PAEs 代谢物及其内标在系统中产生的残留有限，不会对后续样本的准确测定造成影响，符合生物样品分析的相关规范要求[33]。

2.3.4 准确度和日内、日间精密度

按 1.2.3 节制备 4 个水平（LLOQ、LQC、MQC、HQC）的基质匹配质控样本，每个水平样本平行制备 6 份，按 1.3 节方法进行前处理，按 1.4 节条件进样分析，计算相对标准偏差（RSD），得到日内精密度（intra-day RSD）；连续进样 3 d，计算日间精密度（inter-day RSD）；计算 10 种 PAEs 代谢物水平的 RE，通过计算 3 d 内各目标化合物的 RE 均值来考察方法的准确度。如表 3 所示，10 种 PAEs 代谢物的日内、日间精密度均不超过 8.3%，准确度为 −10.5%~7.3%，符合生物样品分析的相关规范要求[33]。

2.3.5 基质效应

尿液基质可能会对目标化合物的准确定量产生干扰，为降低基质效应（matrix effect，ME），本实验采用同位素内标法进行定量。为进一步验证本方法的适用性，考察了尿液对 10 种 PAEs 代谢物的基质效应。各取 200 μL 不同受试者来源（共 6 位）的实际尿液（每个样本来源平行处理 3 份），向同一来源的 3 个样本中分别加入低、中、高 3 个水平（LQC、MQC、HQC）的质控工作溶液。按 1.3 节方法进行前处理，随后进样分析，得到目标化合物峰面积与内标峰面积的比值（A）；同时，以 200 μL 超纯水代替实际尿液，按照相同方法操作，随后进样分析，得到目标化合物峰面积与内标峰面积的比值（B）。根据 ME=A/B×100% 计算基质效应，并计算基质效应的 RSD（n=6）。结果表明，在 3 个质控水平下，10 种 PAEs 代谢物的 ME 为 86.5%~113.7%，RSD 均不超过 15%，符合生物样品分析的相关规范要求[33]，不会干扰 10 种 PAEs 代谢物的准确测定。

2.3.6 回收率

向空白人工尿液中分别添加低、中、高 3 个水平（LQC、MQC、HQC）的质控工作溶液，按 1.3 节方法进行前处理，每个质控水平平行测定 6 次，并计算回收率和 RSD。实验结果表明，10 种 PAEs 代谢物在 3 个质控水平下的回收率为 91.7%~102.9%，RSD 为 1.0%~6.4%，说明所建分析方法的回收率和精密度均良好，能够满足对实际样本的检验分析要求。

表 3 10 种 PAEs 代谢物在 4 个质控水平下的准确度和日内、日间精密度

Table 3 Accuracies, intra- and inter-day RSDs of the 10 PAE metabolites under four quality control (QC) levels

Compound	QC level/(ng/mL)	Intra-day RSD/% (n=6)	Inter-day RSD/% (n=18)	Accuracy/% (n=18)
MMP	5	4.3	4.8	−0.4
	15	2.4	3.3	3.6
	200	0.7	1.7	3.4
	800	2.3	3.2	1.7
MEP	5	2.8	8.2	−2.1
	15	1.6	4.9	4.9
	200	1.0	4.2	6.1
	800	1.7	5.4	0.3
MiBP	5	3.6	5.0	2.0
	15	2.1	2.4	4.6
	200	0.3	1.6	5.4
	800	1.4	2.5	−1.1
MnBP	5	2.2	3.8	−2.3
	15	2.5	4.3	−1.0
	200	2.3	3.4	−2.4
	800	2.0	3.4	−6.3
MEOHP	1	5.0	4.2	−1.2
	3	2.6	3.4	3.8
	40	1.5	1.8	3.3
	160	1.4	1.7	0.1
MBzP	5	6.3	7.3	−3.3
	15	1.5	2.4	4.0
	200	3.2	3.0	4.8
	800	1.4	2.4	0.6
MCHP	1	6.1	8.3	−6.1
	3	2.9	4.7	1.9
	40	2.5	2.9	0.9
	160	2.3	3.4	0.4
MPP	1	6.6	5.3	−10.5
	3	5.5	4.9	−2.2
	40	2.7	3.3	−1.4
	160	3.6	3.3	0.5
cx-MINCH	1	3.1	3.9	−4.9
	3	1.6	2.2	1.3
	40	2.6	2.4	0.5
	160	1.5	1.8	−1.1
MnOP	5	2.9	4.0	1.8
	15	1.3	2.6	7.1
	200	1.4	3.1	7.3
	800	1.7	3.4	7.2

2.4　实际样品测定

选择 60 名长期居住在上海的志愿者参与本研究。收集这些志愿者在早晨 5 点至 8 点期间的晨尿样本,随后按 1.3 节方法进行前处理,按 1.4 节条件进样分析。实验结果显示,每位志愿者的尿液中均可检出 1~6 种 PAEs 代谢物,其中 MEOHP、MnBP、MMP 和 MiBP 是较为常见的检出物质,它们的检出率分别为 100%、97%、75% 和 60%;而 MBzP、MnOP、MPP 和 MCHP 在 60 名志愿者的尿液中均未检出。具体结果见表 4。

表 4　60名志愿者尿液中10种PAEs代谢物的检出含量

Table 4　Detectable contents of the 10 PAE metabolites in the urine of 60 volunteers

Sample	Contents/(ng/mL)									
	MMP	MEP	MiBP	MnBP	MEOHP	MBzP	MCHP	MPP	cx-MINCH	MnOP
1	14.3	7.6	9.7	28.5	6.2	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	32.0	ND	8.8	60.0	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	25.1	3.2	ND	ND	ND	ND	ND
4	9.4	ND	8.0	48.8	4.2	ND	ND	ND	ND	ND
5	10.7	7.7	14.7	95.5	7.5	ND	ND	ND	ND	ND
6	9.9	16.7	7.8	36.4	1.5	ND	ND	ND	ND	ND
7	14.8	ND	16.3	53.9	6.3	ND	ND	ND	ND	ND
8	5.7	455.9	6.7	34.6	51.7	ND	ND	ND	94.8	ND
9	7.7	44.7	ND	12.1	4.6	ND	ND	ND	ND	ND
10	88.7	8.1	5.5	22.8	5.5	ND	ND	ND	ND	ND
11	ND	48.3	ND	11.9	1.5	ND	ND	ND	ND	ND
12	5.3	101.8	ND	31.7	39.1	ND	ND	ND	208.3	ND
13	10.7	11.7	10.7	95.8	5.5	ND	ND	ND	ND	ND
14	12.4	ND	9.6	49.5	6.2	ND	ND	ND	ND	ND
15	ND	ND	ND	8.6	6.9	ND	ND	ND	ND	ND
16	ND	ND	ND	17.9	3.7	ND	ND	ND	ND	ND
17	10.1	14.2	16.2	55.6	5.9	ND	ND	ND	ND	ND
18	8.8	ND	ND	11.8	1.3	ND	ND	ND	1.5	ND
19	8.6	6.6	ND	7.5	1.9	ND	ND	ND	ND	ND
20	12.3	5.3	8.9	55.9	5.5	ND	ND	ND	ND	ND
21	5.6	69.1	7.4	24.3	3.2	ND	ND	ND	ND	ND
22	9.3	ND	5.5	13.1	2.0	ND	ND	ND	ND	ND
23	10.0	ND	5.4	25.3	6.1	ND	ND	ND	ND	ND
24	ND	133.6	ND	17.3	1.7	ND	ND	ND	ND	ND
25	7.9	ND	12.8	26.8	6.1	ND	ND	ND	ND	ND
26	ND	ND	8.0	27.8	6.7	ND	ND	ND	ND	ND
27	14.1	ND	ND	20.8	6.1	ND	ND	ND	ND	ND
28	ND	1371.1	ND	12.9	3.0	ND	ND	ND	ND	ND
29	ND	ND	ND	22.6	4.1	ND	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND	23.7	ND	ND	ND	ND	ND
31	5.9	ND	7.5	27.3	6.2	ND	ND	ND	ND	ND
32	ND	8.9	ND	64.1	3.9	ND	ND	ND	ND	ND
33	9.0	162.4	ND	30.4	3.7	ND	ND	ND	ND	ND
34	8.9	22.2	ND	36.6	3.4	ND	ND	ND	ND	ND
35	7.5	ND	ND	24.6	2.6	ND	ND	ND	ND	ND
36	ND	ND	ND	21.6	3.2	ND	ND	ND	ND	ND
37	5.5	392.4	11.6	39.2	12.8	ND	ND	ND	ND	ND

表 4 （续）
Table 4 （Continued）

Sample	Contents/(ng/mL)									
	MMP	MEP	MiBP	MnBP	MEOHP	MBzP	MCHP	MPP	cx-MINCH	MnOP
38	12.8	7.1	180.5	71.2	12.7	ND	ND	ND	ND	ND
39	9.6	ND	11.8	79.7	5.0	ND	ND	ND	ND	ND
40	9.8	ND	7.6	27.5	36.3	ND	ND	ND	ND	ND
41	5.3	ND	ND	22.0	4.0	ND	ND	ND	ND	ND
42	11.9	13.8	7.3	23.7	11.6	ND	ND	ND	ND	ND
43	5.0	ND	7.1	7.5	4.2	ND	ND	ND	ND	ND
44	9.5	ND	7.5	25.9	3.7	ND	ND	ND	ND	ND
45	7.2	11.5	10.6	89.5	6.8	ND	ND	ND	ND	ND
46	22.1	ND	10.4	62.3	4.1	ND	ND	ND	ND	ND
47	5.4	ND	7.7	9.6	4.8	ND	ND	ND	ND	ND
48	13.3	7.2	7.9	56.0	24.4	ND	ND	ND	ND	ND
49	9.3	ND	6.1	63.7	2.4	ND	ND	ND	ND	ND
50	9.4	ND	7.0	23.7	4.0	ND	ND	ND	ND	ND
51	8.4	6.6	21.5	87.3	9.9	ND	ND	ND	ND	ND
52	8.7	8.8	9.9	63.0	3.9	ND	ND	ND	ND	ND
53	ND	ND	ND	39.9	4.9	ND	ND	ND	1.8	ND
54	ND	ND	ND	25.4	1.7	ND	ND	ND	ND	ND
55	ND	ND	ND	ND	101.6	ND	ND	ND	ND	ND
56	17.3	49.1	30.8	91.7	11.6	ND	ND	ND	ND	ND
57	31.6	ND	15.9	15.0	6.8	ND	ND	ND	ND	ND
58	5.5	1087.6	ND	18.3	3.7	ND	ND	ND	ND	ND
59	7.1	ND	5.6	24.6	4.2	ND	ND	ND	ND	ND
60	10.7	ND	6.4	23.4	8.5	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected.

3 结论

本研究将固相萃取与 UPLC-MS/MS 结合，建立了可同时测定尿液中 10 种 PAEs 代谢物的高灵敏度方法。该方法简便、快速，准确度和精密度高，适用于评估 PAEs 在大规模人群中的暴露水平。未来，可进一步结合暴露组学研究，以评估 PAEs 对人体健康的潜在风险，为制定相关污染物的使用法规提供科学依据。

参考文献：

[1] Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, et al. Risk Anal, 2006, 26(3): 803

[2] Kim D Y, Chun S H, Jung Y, et al. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(22): 8582

[3] Xie H, Han W, Xie Q, et al. J Hazard Mater, 2022, 422: 126848

[4] Wittassek M, Koch H M, Angerer J, et al. Mol Nutr Food Res, 2011, 55(1): 7

[5] Giuliani A, Zuccarini M, Cichelli A, et al. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(16): 5699

[6] Pagoni A, Arvaniti O S, Kalantzi O I. Environ Res, 2022, 212: 113194

[7] Huang C, Zhang Y J, Liu L Y, et al. Sci Total Environ, 2021, 782: 146806

[8] Chang W H, Herianto S, Lee C C, et al. Sci Total Environ, 2021, 786: 147371

[9] Nguyen V K, Colacino J A, Arnot J A, et al. Environ Int, 2019, 122: 117

[10] Golestanzadeh M, Riahi R, Kelishadi R. Environ Sci: Processes Impacts, 2020, 22(4): 873

[11] Hlisníková H, Petrovičová I, Kolena B, et al. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(18): 6811

[12] Yi H, Wu H, Zhu W, et al. Front Cell Dev Biol, 2023, 11: 1154923

[13] Jin S, Cui S, Mu X, et al. Environ Sci Pollut Res, 2023, 30(59): 123770

[14] Wu A H, Franke A A, Wilkens L R, et al. Breast Cancer Res, 2021, 23(1): 23

[15] Dueñas Moreno J, Mora A, Cervantes Avilés P, et al. Environ Int, 2022, 170: 107550

[16] Guo Y, Kannan K. Environ Sci Technol, 2011, 45(8): 3788

[17] Tran H T, Nguyen M K, Hoang H G, et al. Chemosphere, 2022, 307: 135989

[18] Tran T M, Kannan K. Arch Environ Contam Toxicol,

2015, 68(3): 489
[19] Koch H M, Ruther M, Schutze A, et al. Int J Hyg Environ Health, 2017, 220(2 Pt A): 130
[20] Haines D A, Saravanabhavan G, Werry K, et al. Int J Hyg Environ Health, 2017, 220(2 Pt A): 13
[21] Cao Z, Lin S, Zhao F, et al. Environ Int, 2021, 146: 106252
[22] Martens F K, Martens M A. Acta Clin Belg, 2002, 57 Suppl 1: 16
[23] Kim M, Song N R, Choi J H, et al. Sci Total Environ, 2014, 470/471: 1408
[24] Lin X T, Wang X Y, Zhao J Q. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(5):528
林兴桃, 王小逸, 赵靖强. 色谱, 2016, 34(5): 528
[25] Bai C, Liu L, Chen S, et al. Environ Res, 2022, 207: 112657
[26] Shih C L, Hsu J Y, Tien C P, et al. J Food Drug Anal, 2019, 27(2): 585
[27] Pia Dima A, De Santis L, Verlengia C, et al. Clin Mass Spectrom, 2020, 18: 54
[28] Chen M, Tao L, Collins E M, et al. J Chromatogr B, 2012, 904: 73
[29] Kato K, Shoda S, Takahashi M, et al. J Chromatogr B, 2003, 788(2): 407
[30] Myridakis A, Balaska E, Gkaitatzi C, et al. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(9): 2509
[31] Gao H, Xu Y Y, Sun L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(6): 622
高慧, 许媛媛, 孙丽, 等. 色谱, 2015, 33(6): 622
[32] Zhang X, Qiu T, Fu H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(9): 895
张续, 邱天, 付慧, 等. 色谱, 2018, 36(9): 895
[33] Chinese Pharmacopoeia Commission. Guidelines for Validation of Quantitative Analysis Methods of Biological Samples. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 466
国家药典委员会. 生物样品定量分析方法验证指导原则. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466