

超高效液相色谱-串联质谱法测定人体全血中 22 种有机磷酸酯及其代谢物和 11 种邻苯二甲酸酯类代谢物

石飞云¹, 徐浩宇², 黎俊宏¹, 徐梦媛^{1*}

(1. 常州市疾病预防控制中心, 江苏 常州 213022; 2. 常州市中医医院, 江苏 常州 213022)

摘要: 有机磷酸酯(organic phosphate esters, OPEs)和邻苯二甲酸酯(phthalate esters, PAEs)是两类人工合成的化合物,常作为阻燃剂和增塑剂以物理结合的方式被添加到各种工业和消费品中,二者均具有多脏器累积毒性。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)建立了全血中 22 种 OPEs 及其二酯代谢物(mOPEs)和 11 种邻苯二甲酸酯类代谢物(mPAEs)的检测方法。全血样本采用 HMR S-micro BIO 96 孔固相萃取柱净化,使用 Ghost Trap DS-HP 色谱柱(30 mm×2.1 mm)作为背景鬼峰捕集柱,以 ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)作为分析柱,采用 0.5 mmol/L 乙酸铵溶液和甲醇为流动相进行梯度洗脱,质谱采用电喷雾离子源(ESI)电离,以正负离子扫描、多反应监测(MRM)模式检测,同位素内标法定量。结果表明,33 种目标化合物在 15 min 内均可实现基线分离,目标化合物在相应质量浓度范围内线性关系良好(r 为 0.993 3~0.999 8),检出限为 0.003~0.31 ng/mL,定量限为 0.01~1.02 ng/mL。全血样本加标回收率为 60.5%~138.3%,相对标准偏差(RSD)为 1.6%~11.0%。应用该方法对 14 个全血样本进行检测,在 14 份样本中均检出磷酸三(1-氯-2-丙基)酯、磷酸三苯酯(TPHP)、磷酸 2-乙基己基二苯基酯、邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羟己基)酯、邻苯二甲酸单正丁酯和邻苯二甲酸单正辛酯,且 TPHP 的检出量最高(10.04 ng/mL)。该方法具有操作简便、灵敏度高、准确性好、所需样品量少以及节约试剂等优点,适用于人体的生物监测,为人群有机磷酸酯和邻苯二甲酸酯类物质的监测提供了理论依据。

关键词: 有机磷酸酯;邻苯二甲酸酯类代谢物;全血;超高效液相色谱-串联质谱法

中图分类号:O658

文献标识码:A

Determination of 22 organophosphates and their metabolites and 11 phthalate metabolites in human whole blood by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SHI Feiyun¹, XU Haoyu², LI Junhong¹, XU Mengyuan^{1*}

(1. Changzhou Center for Disease Control and Prevention, Changzhou 213022, China;

2. Changzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changzhou 213022, China)

Abstract: Organic phosphate esters (OPEs) and phthalate esters (PAEs) are two classes of synthetic compounds widely incorporated into various industrial and consumer products as flame retardants and plasticizers. Both exhibit multi-organ cumulative toxicity. In this study, an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed for the determination of 22 OPEs and their diester metabolites (mOPEs) and 11 phthalate ester metabolites (mPAEs) in whole blood. The whole blood samples were extracted with 0.1% formic acid-acetonitrile by liquid-liquid extraction for protein precipitation, and then purified by HMR S-micro BIO 96-well solid phase extraction column. The filtrate was blown to near dryness with

收稿日期:2025-09-28

* 通信联系人.Tel:0519-86684627, E-mail:429330434@qq.com.

基金项目: 2024 年常州市卫生健康委员会青年人才科技项目(QN202463, QN202425);江苏省第六期“333 高层次人才培养工程”第三层次培养对象[(2022)3-4-163].

Foundation item: Youth Talent Science and Technology Project of Changzhou Municipal Health Commission in 2024 (Nos. QN202463, QN202425); the Third Level Training Objects of the Sixth “333 High Level Talent Training Project” in Jiangsu Province [(2022) 3-4-163].

nitrogen, and reconstituted with 0.1% formic acid-acetonitrile solution. The target compounds were detected by UPLC-MS/MS. A Ghost Trap DS-HP chromatographic column (30 mm×2.1 mm) was used as the background ghost peak trap column, and an ACQUITY UPLC® BEH C18 chromatographic column (150 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) was used as the analytical column. Methanol and 0.5 mmol/L ammonium acetate were used as mobile phase for gradient elution. Electrospray ionization (ESI) was used for MS detection, with both positive and negative ion scanning in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Isotope internal standard method was used for quantification. The results showed that 33 target compounds could be separated within 15 min, and good linear relationships were observed for all target compounds across their respective mass concentration ranges ($r=0.993\ 3\text{--}0.999\ 8$). The limits of detection were 0.003–0.31 ng/mL and the limits of quantification were 0.01–1.02 ng/mL. The spiked recoveries of 33 targets in whole blood samples ranged from 60.5% to 138.3%, with relative standard deviations (RSDs) from 1.6% to 11.0%. The detection rates of tris-(2-chloroisopropyl)phosphate (TCiPP), triphenyl phosphate (TPHP), 2-ethylhexyl diphenyl (EHDPP), mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (MEHHP), mono-*n*-butyl phthalate (MNBP) and mono-*n*-octyl phthalate (MOP) were 100% in 14 whole blood samples, and the highest detection amount of TPHP was 10.04 ng/mL. The developed method is simple to operate, sensitive, accurate, requires small sample volumes, and is cost-effective on reagents. It is suitable for human biomonitoring, and provides a theoretical basis for monitoring organic phosphate and phthalic ester substances in the population.

Keywords: organic phosphate esters; phthalate ester metabolites; whole blood; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

有机磷酸酯(OPEs)和邻苯二甲酸酯(PAEs)是人工合成的两大类化学物质,被广泛添加到各种工业和消费品中,主要用作阻燃剂和增塑剂^[1,2]。OPEs是新型阻燃剂的代表物质,已有报道超过40种OPEs作为阻燃剂添加到日常消费品中,包括电子设备、家居装饰、食品包装、纺织品和工程塑料等^[3]。动物实验表明OPEs暴露会产生肝脏毒性、神经毒性、发育毒性、生殖毒性、致癌性和内分泌破坏作用,已被欧盟列为高度关注物质^[4,5]。随着OPEs的毒性作用越来越受到关注,有研究表明部分OPEs在哺乳动物体内通过羟基化和氧化与葡萄糖醛酸酶、谷胱甘肽酶等偶联,形成OPEs二酯代谢产物(mOPEs),这些mOPEs比母体OPEs具有更高的生物毒性^[6],如Su等^[7]证实磷酸三苯酯(TPHP)的代谢产物磷酸二苯酯(DPHP)可以诱导更多基因的异常表达,Xu等^[8]证实小鼠体内

mOPEs的残留水平通常高于OPEs。PAEs是一类广泛使用的高产工业化学品,低相对分子质量PAEs(主链3~6碳原子)普遍用于医疗器械、食品包装、玩具和个人护理产品等领域;高相对分子质量PAEs(主链7~13碳原子)主要用作增塑剂,尤其是添加到聚氯乙烯塑料中以增强其延展性和适应性,广泛应用于电线电缆、地板、涂料等^[9,10]。PAEs是一种抗雄激素干扰物,在动物实验中显示有致畸、致癌作用,同时会影响生殖发育等生理过程,能导致精子质量下降、儿童性早熟,对神经系统、生殖系统和内分泌系统的影响均有报道^[2,11,12]。PAEs的主要代谢产物(mPAEs)是邻苯二甲酸单酯。通常,新陈代谢的第一步是解毒,但体外和体内实验均表明,邻苯二甲酸单酯具有更强的生物活性,对人体危害也更大^[9,13]。此外,PAEs广泛存在于实验室环境和实验耗材中,现场空白浓度可能与

引用本文:石飞云,徐浩宇,黎俊宏,徐梦媛.超高效液相色谱-串联质谱法测定人体全血中22种有机磷酸酯及其代谢物和11种邻苯二甲酸酯类代谢物.色谱,2026,44(6):682-693.

SHI Feiyun, XU Haoyu, LI Junhong, XU Mengyuan. Determination of 22 organophosphates and their metabolites and 11 phthalate metabolites in human whole blood by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(6): 682-693.

收集的样本中的浓度相当^[14], PAEs 在人体和啮齿动物的血浆或尿液中的半衰期均不足 24 h, 多项研究对 PAEs 本体的药代动力学进行了综述, 发现 PAEs 本体在胃肠道中会快速水解为 mPAEs, 单纯检测 PAEs 本体很难抓住这个窗口期, 而以分析 mPAEs 代替 PAEs 的分析可以克服这一限制, 故本研究选择 mPAEs 作为目标化合物。

OPEs 和 PAEs 均是通过物理添加方式与多种日常消费品结合, 在产品使用过程中易通过挥发、浸出或磨损释放到不同的环境介质中, 目前在室内外空气、粉尘、水、土壤、农作物和生物材料中都检测出了不同浓度的 OPEs 和 PAEs^[15]。由于 OPEs 和 PAEs 无处不在, 在日常生活中人们往往会同时暴露于多种 OPEs 和 PAEs, 考虑到混合暴露的累加效应, 即使单个物质的暴露量低于规定剂量, 多种化合物的累积暴露也可能影响人类健康^[16]。目前国内外对于 OPEs 和 PAEs 的研究主要集中在粉尘^[17,18]、空气^[19,20]、水体^[21,22]和土壤^[23]等外部暴露, 对于人体内暴露评估较少, 且主要集中于尿液的检测, 鉴于 OPEs 和 PAEs 的广泛应用和繁多的暴露途径, 内部暴露评估可以提供更真实的人类暴露情况, 血液中 OPEs 和 PAEs 水平可能比尿液水平更能揭示人类长期暴露程度。此外, 现有报道多为 OPEs 或 PAEs 的单一类别检测, OPEs 和 PAEs 同时检测尚属罕见。

关于 OPEs 和 PAEs 的内暴露研究, 到目前为止, 多集中于尿液基质, 而针对其在人体血液中的直接检测和报道相对较少。Wang 等^[24]采用液-液萃取 (LLE) 结合固相萃取 (SPE) 柱从 1 mL 全血中提取 OPEs, 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定 OPEs。Liu 等^[25]开发了一种从 500 μ L 血清中提取 OPEs 的 SPE 预处理方法。SPE、LLE 和蛋白沉淀法 (PPT) 是 LC-MS/MS 常用的预处理方法。常规的 SPE 法在样品预处理过程中烦琐耗时且实验成本高, 限制了其在大样本人群生物监测中的应用, 复杂的处理工艺容易增加实验的不确定性, 影响测定结果的稳定性和准确性。LLE 是传统的前处理方法, 方便快捷, 但其缺点是消耗大量有机溶剂, 且需要样品量较大, 不能满足于血液样品的常规检测。PPT 是一种广泛应用于生物样品的净化阳离子和提取的方法, 具有简单、成本低、易于实现等优点, 但其容易带来基质效应。HMR S-micro BIO 96 孔固相萃取板是一种新型的固相萃

取材料, 其为滤过式 SPE, 简化了常规 SPE 活化、淋洗、洗脱等步骤, 过程简单, 快速。同时, 高比表面积的聚合物骨架可以有效吸附拦截血液样品中的磷脂和大分子, 去除基质干扰。

基于此, 本研究将高通量的 HMR S-micro BIO 96 孔固相萃取板与 UPLC-MS/MS 技术结合, 建立了一种可同时测定人体全血中 22 种 OPEs、mOPEs 和 11 种 mPAEs 的方法, 为全面评估人体内新型污染物 OPEs 和 PAEs 的暴露情况与健康风险提供方法学支持。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

岛津 8060NX 超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪 (日本岛津公司); 固相萃取正压装置、96 孔氮吹仪、HMR S-micro BIO 96 孔固相萃取板 (20 mg, 北京纳鸥科技有限公司); 5804R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Multi Reax 涡旋混匀器 (德国 Heidolph 公司); 甲醇、乙腈和超纯水均为 LC-MS 级 (德国默克公司); 甲酸 (LC-MS 级, 美国阿拉丁公司); 乙酸铵 (LC-MS 级, 北京百灵威科技有限公司)。

14 种 OPEs 标准品和 10 种 OPEs 内标质量浓度均为 100.0 mg/L, 购自上海安谱瑞世标准科技服务有限公司; 8 种 mOPEs 标准品 (纯度 94%~98%) 和 4 种 mOPEs 内标 (纯度 95%~98%) 购自 Toronto Research Chemicals; 11 种 mPAEs 标准品 (纯度 95%~100%) 和 11 种 mPAEs 内标 (纯度 95%~98%) 购自 Cambridge Isotope Laboratories。目标化合物及同位素内标信息详见表 1。

本研究获得常州疾病预防控制中心医学伦理委员会批准 (批准文件编号: 常疾控伦审 [2024] 09 号)。样品采集: 采用含抗凝剂 (EDTA-K₂) 的采血管采集血液, 轻柔颠倒采血管 6~8 次混匀后, 转移至 10 mL 玻璃离心管中, 于 -80 $^{\circ}$ C 条件下保存。

1.2 标准溶液的配制

混合标准储备液: 准确称取 33 种目标化合物标准品于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度为 100 ng/mL 的混合标准储备液, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

混合内标储备溶液: 准确称取 25 种内标标准品于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度为 100 ng/mL 的混合内标储备液, 于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

表1 33种目标化合物及25种同位素内标的基本信息
Table 1 Information of the 33 target compounds and the 25 isotope internal standards (IS)

Compound	Abbr.	CAS No.	Formula	M_r
Organic phosphate esters (OPEs, 有机磷酸酯)				
Trimethyl phosphate (磷酸三甲酯)	TMP	512-56-1	$C_3H_9O_4P$	140.07
Tris-(2-chloroethyl) phosphate (磷酸三(2-氯乙基)酯)	TCEP	115-96-8	$C_6H_{12}Cl_3O_4P$	285.49
Triisopropyl phosphate (磷酸三异丙酯)	TiPP	513-02-0	$C_9H_{21}O_4P$	224.23
Tripnonyl phosphate (磷酸三丙酯)	TnPP	513-08-6	$C_9H_{21}O_4P$	224.23
2,2-Bis(chloromethyl) trimethylene bis(bis(2-chloroethyl)phosphate (磷酸2,2-双氯甲基-三亚甲基-双(双(2-氯乙基))酯)	V6	38051-10-4	$C_{13}H_{24}Cl_6O_8P_2$	582.99
Tris-(2-chloroisopropyl)phosphate (磷酸三(1-氯-2-丙基)酯)	TCiPP	13674-84-5	$C_9H_{18}Cl_3O_4P$	327.57
Tris(2-chloro-1-(chloromethyl)ethyl)phosphate (磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯)	TDCiPP	13674-87-8	$C_9H_{15}Cl_6O_4P$	430.90
Tris(2,3-dibromopropyl) phosphate (三-(2,3-二溴丙基)-磷酸酯)	TDBPP	126-72-7	$C_9H_{15}Br_3O_4P$	697.61
Triphenyl phosphate (磷酸三苯酯)	TPHP	115-86-6	$C_{18}H_{15}O_4P$	326.28
Triisobutyl phosphate (磷酸三异丁酯)	TiBP	126-71-6	$C_{12}H_{27}O_4P$	266.31
Tributyl phosphate (磷酸三丁酯)	TnBP	126-73-8	$C_{12}H_{27}O_4P$	266.31
Tris-(2-butoxyethyl) phosphate(磷酸三(2-丁氧基乙基)酯)	TBOEP	78-51-3	$C_{18}H_{39}O_7P$	398.47
Tricresyl phosphate (磷酸三间甲苯酯)	TMPP	1330-78-5	$C_{21}H_{21}O_4P$	368.36
2-Ethylhexyl diphenyl phosphate (磷酸2-乙基己基二苯基酯)	EHDPP	1241-94-7	$C_{20}H_{27}O_4P$	362.41
Organic phosphate esters of metabolites (mOPEs, 有机磷酸酯代谢物)				
Bis(2-butoxyethyl)2-hydroxyethyl phosphate triester (磷酸双(2-丁氧基乙基)2-羟基乙基三酯)	BBOEHP	1477494-86-2	$C_{14}H_{31}O_7P$	342.37
Bis(2-butoxyethyl)2-(3-hydroxyethyl)ethyl phosphate triester (双(2-丁氧基乙基)2-(3-羟基丁氧基)乙基磷酸酯)	OH-TBOEP	1477494-87-3	$C_{18}H_{39}O_8P$	414.47
Bis(2-chloroethyl) hydrogen phosphate (磷酸氢二(2-氯乙基)酯)	BCEP	3040-56-0	$C_4H_9Cl_2O_4P$	222.99
Dibutyl phosphate (磷酸二正丁酯)	DNBP	107-66-4	$C_8H_{19}O_4P$	210.21
Diphenyl phosphate (磷酸二苯酯)	DPHP	838-85-7	$C_{12}H_{11}O_4P$	250.19
Bis(2-ethylhexyl) phosphate (磷酸二(2-乙基己基)酯)	BEHP	298-07-7	$C_{16}H_{35}O_4P$	322.42
Bis(1-chloro-2-propyl) phosphate (磷酸二(2-氯丙基)酯)	BCiPP	789440-10-4	$C_{12}H_{26}Cl_2O_8P_2$	502.08
Bis(butoxyethyl phosphate (磷酸二(2-丁氧基乙基)酯)	BBOEP	14260-97-0	$C_{12}H_{27}O_6P$	298.31
Phthalate ester metabolites (mPAEs, 邻苯二甲酸酯代谢物)				
Monobenzyl phthalate (邻苯二甲酸单苄酯)	MBZP	2528-16-7	$C_{15}H_{12}O_4$	256.25
Monocyclohexyl phthalate (邻苯二甲酸单环己酯)	MCHP	7517-36-4	$C_{14}H_{16}O_4$	248.27
Monoisodecyl phthalate (邻苯二甲酸单异癸酯)	MDP	69725-01-5	$C_{18}H_{26}O_4$	306.42
Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate (邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羟基己基)酯)	MEHHP	40321-99-1	$C_{16}H_{22}O_5$	292.327
Mono(2-ethylhexyl) phthalate (邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯)	MEHP	4376-20-9	$C_{16}H_{22}O_4$	278.3
Mono(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate (邻苯二甲酸单(2-乙基-5-氧己基)酯)	MEOHP	40321-98-0	$C_{16}H_{20}O_5$	292.33
Monoethyl phthalate (邻苯二甲酸单乙酯)	MEP	2306-33-4	$C_{10}H_{10}O_4$	194.18
Monomethyl phthalate (邻苯二甲酸单甲酯)	MMP	4376-18-5	$C_9H_8O_4$	180.16
Mono-n-butyl phthalate (邻苯二甲酸单正丁酯)	MNBP	131-70-4	$C_{12}H_{14}O_4$	222.24
Monoisononyl phthalate (邻苯二甲酸单异壬酯)	MNP	297182-83-3	$C_{17}H_{24}O_4$	292.4
Mono-n-octyl phthalate (邻苯二甲酸单正辛酯)	MOP	5393-19-1	$C_{16}H_{22}O_4$	278.3
IS				
TMP-D ₉ (磷酸三甲酯-D ₉)	TMP-D ₉	32176-12-8	$C_3D_9O_4P$	149.13
TnPP-D ₂₁ (磷酸三丙酯-D ₂₁)	TnPP-D ₂₁	1219794-92-9	$C_9D_{21}O_4P$	245.36
TnBP-D ₂₇ (磷酸三丁酯-D ₂₇)	TnBP-D ₂₇	61196-26-7	$C_{12}D_{27}O_4P$	293.48
TPHP-D ₁₅ (磷酸三苯酯-D ₁₅)	TPHP-D ₁₅	1173020-30-8	$C_{18}D_{15}O_4P$	341.38

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

Compound	Abbr.	CAS No.	Formula	M_r
TCEP-D ₁₂ (磷酸三(2-氯乙基)酯-D ₁₂)	TCEP-D ₁₂	1276500-47-0	C ₆ D ₁₂ Cl ₃ O ₄ P	297.56
TCiPP-D ₁₈ (磷酸三(2-氯丙基)酯-D ₁₈)	TCiPP-D ₁₈	1447569-78-9	C ₉ D ₁₈ Cl ₃ O ₄ P	345.68
TDCPP-D ₁₅ (磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯-D ₁₅)	TDCPP-D ₁₅	1447569-77-8	C ₉ D ₁₅ Cl ₆ O ₄ P	446.00
TBOEP-D ₂₇ (三(2-丁氧基乙基)磷酸酯-D ₂₇)	TBOEP-D ₂₇	78-51-3-D ₂₇	C ₁₈ H ₁₂ D ₂₇ O ₇ P	425.64
V6-D ₁₆ (2,2-双氯甲基-三亚甲基-双[双(2-氯乙基)]磷酸酯-D ₁₆)	V6-D ₁₆	38051-10-4-D ₁₆	C ₁₃ H ₈ D ₁₆ Cl ₆ O ₈ P ₂	599.09
TDBPP-D ₁₅ (三-(2,3-二溴丙基)-磷酸酯-D ₁₅)	TDBPP-D ₁₅	157801-77-9	C ₉ D ₁₅ Br ₆ O ₄ P	712.7
BBOEHEP-D ₄ (双(2-丁氧基乙基)-2-羟乙基磷酸三酯-D ₄)	BBOEHEP-D ₄	2469195-92-2	C ₁₄ H ₂₇ D ₄ O ₇ P	346.39
BCEP-D ₈ (磷酸二(2-氯乙基)酯-D ₈)	BCEP-D ₈	1477495-02-5	C ₄ HD ₈ Cl ₂ O ₄ P	231.04
DPHP-D ₁₀ (磷酸二苯酯-D ₁₀)	DPHP-D ₁₀	1477494-97-5	C ₁₂ HD ₁₀ O ₄ P	260.25
BBOEP-D ₈ (磷酸二(2-丁氧基乙基)酯-D ₈)	BBOEP-D ₈		C ₁₂ H ₁₉ D ₈ O ₆ P	306.36
MBZP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单苄酯- ¹³ C ₂)	MBZP- ¹³ C ₂	2528-16-7	C ₁₁ C ₄ H ₁₂ O ₄	260.22
MCHP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单环己酯- ¹³ C ₂)	MCHP- ¹³ C ₂	7517-36-4	C ₁₁ C ₄ H ₁₆ O ₄	252.25
MDP-D ₄ (邻苯二甲酸单异癸酯-D ₄)	MDP-D ₄		C ₁₈ H ₂₂ D ₄ O ₄	310.42
MEHHP- ¹³ C ₄ (邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羟己基)酯- ¹³ C ₄)	MEHHP- ¹³ C ₄	40321-99-1	C ₁₂ C ₄ H ₂₂ O ₅	298.31
MEHP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯- ¹³ C ₂)	MEHP- ¹³ C ₂	959266-61-6	C ₁₂ C ₄ H ₂₂ O ₄	282.31
MEOHP- ¹³ C ₄ (邻苯二甲酸单(2-乙基-5-氧己基)酯- ¹³ C ₄)	MEOHP- ¹³ C ₄	40321-98-0	C ₁₂ C ₄ H ₂₀ O ₅	296.30
MEP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单乙酯- ¹³ C ₂)	MEP- ¹³ C ₂	2306-33-4	C ₆ C ₄ H ₁₀ O ₄	198.16
MMP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单甲酯- ¹³ C ₂)	MMP- ¹³ C ₂	4379-18-5	C ₅ C ₄ H ₈ O ₄	184.13
MNBP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单正丁酯- ¹³ C ₂)	MNBP- ¹³ C ₂	131-70-4	C ₈ C ₄ H ₁₄ O ₄	226.21
MNP-D ₄ (邻苯二甲酸单异壬酯-D ₄)	MNP-D ₄		C ₁₇ H ₂₀ D ₄ O ₄	296.21
MOP- ¹³ C ₂ (邻苯二甲酸单正辛酯- ¹³ C ₂)	MOP- ¹³ C ₂	5393.19-1	C ₁₂ C ₄ H ₂₂ O ₄	282.31

混合标准工作液:使用时,准确吸取不同体积的混合标准储备液和 1.0 mL 混合内标储备溶液,用 0.1% 甲酸乙腈定容至 10.0 mL 配制成 33 种目标化合物质量浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、50 ng/mL,25 种同位素内标质量浓度为 10 ng/mL 的标准工作溶液。

1.3 样品前处理

将全血样品从-80 ℃冰箱中取出,置于室温下解冻,解冻后,使用玻璃枪头准确吸取 200 μL 全血于 10 mL 玻璃离心管中,加入 100 μL 混合内标储备溶液,加入 2.0 mL 0.1% 甲酸乙腈提取,涡旋混匀 10 min,超声 20 min,5 000 r/min 离心 5 min,将 96 孔固相萃取板用 2 mL/孔的乙腈加压冲洗,取全部上清液过柱,采用正压装置施加压力,使其以 1~2 mL/min 的流速通过固相萃取柱,待管内液体全部流出,沿管壁继续加入 1 mL 乙腈,加压待全部液体流出;将洗脱液在 40 ℃下氮吹至近干,加入 100 μL 0.1% 甲酸乙腈复溶,过 0.22 μm PTFE 滤头,转移至进样瓶(带玻璃内衬管),待测定。

设置 0.1% 甲酸乙腈复溶液为过程空白,健康人群全血样品通过上述前处理后设置为全血空白。

1.4 仪器分析条件

1.4.1 液相色谱条件

将 Ghost Trap DS-HP 色谱柱(30 mm×2.1 mm)连接在混合器和进样器之间作为背景鬼峰捕集柱;以 ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱(150 mm×2.1 mm,1.7 μm,美国 Waters 公司)为分析柱;流动相:A 为 0.5 mmol/L 乙酸铵水溶液,B 为甲醇;梯度洗脱程序:0~2.0 min,5%B;2.0~2.1 min,5%B~50%B;2.1~9.0 min,50%B~98%B;9.0~12.0 min,98%B;12.0~13.0 min,98%B~5%B;13.0~15.0 min,5%B;流速:0.30 mL/min;柱温:40 ℃;进样体积:5 μL。

1.4.2 质谱条件

电喷雾电离源离子模式(ESI⁺/ESI⁻);多反应监测(MRM)模式采集;雾化气流量:3 L/min,加热气流量:15 L/min,接口温度:400 ℃,脱溶剂管温度:250 ℃,脱溶剂温度:650 ℃,加热块温度:400 ℃。化合物质谱参数见表 2。

表2 33种目标化合物及25种内标的质谱参数
Table 2 MS parameters of the 33 target compounds and 25 isotope internal standard compounds

Compound	Retention time/min	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Q1/V	CE/V	Q3/V	IS
TMP	4.51	141.1	109.0 [*] , 79.0	-21	-19	-20	TMP-D ₉
TCEP	5.92	285.1	63.0 [*] , 99.0	-17	-27	-25	TCEP-D ₁₂
TiPP	7.25	225.1	99.0 [*] , 141.0	-14	-20	-18	TnPP-D ₂₁
TnPP	6.95	225.1	99.0 [*] , 141.0	-14	-20	-18	TnPP-D ₂₁
V6	7.31	582.9	361.0 [*] , 297.0	-38	-19	-25	V6-D ₁₆
TCiPP	7.26	327.1	99.0 [*]	-20	-21	-18	TCiPP-D ₁₈
TDCiPP	8.28	431.1	99.0 [*] , 209.0	-26	-27	-18	TDCPP-D ₁₅
TDBPP	8.71	698.6	99.0 [*] , 298.9	-24	-28	-18	TDBPP-D ₁₅
TPHP	8.39	327.1	77.0 [*] , 215.1	-20	-41	-14	TPHP-D ₁₅
TiBP	9.03	267.2	99.0 [*] , 155.0	-17	-20	-18	TnBP-D ₂₇
TnBP	8.90	267.2	99.0 [*] , 155.0	-17	-21	-17	TnBP-D ₂₇
TBOEP	9.33	399.4	199.1 [*] , 299.2	-24	-17	-21	TBOEP-D ₂₇
TMPP	9.97	369.4	91.0 [*] , 166.1	-22	-39	-17	TPHP-D ₁₅
EHDPP	10.33	385.2	273.0 [*]	-24	-16	-19	TPHP-D ₁₅
BBOEHEP	7.14	343.0	243.0 [*] , 45.0	-23	-12	-17	BBOEHEP-D ₄
OH-TBOEP	7.79	415.0	45.0 [*] , 199.0	-20	-13	-15	TBOEP-D ₂₇
BCEP	4.37	223.0	99.1 [*] , 62.9	-15	-16	-24	BCEP-D ₈
DNBP	5.38	209.1	79.0 [*] , 153.0	20	23	13	DPHP-D ₁₀
DPHP	5.09	249.0	93.0 [*] , 155.0	22	30	30	DPHP-D ₁₀
BEHP	8.60	321.0	79.0 [*] , 209.2	12	29	13	TPHP-D ₁₅
BCiPP	5.08	249.0	93.0 [*] , 154.7	21	28	15	DPHP-D ₁₀
BBOEP	5.86	297.0	79.0 [*] , 197.2	22	25	12	BBOEP-D ₈
MBZP	5.02	255.0	77.0 [*] , 183.0	23	21	30	MBZP- ¹³ C ₂
MCHP	5.43	247.1	77.0 [*] , 97.1	23	19	28	MCHP- ¹³ C ₂
MDP	7.85	305.1	154.9 [*] , 77.0	28	24	30	MDP-D ₄
MEHHP	5.26	293.0	121.0 [*] , 145.0	24	16	12	MEHHP- ¹³ C ₄
MEHP	6.70	276.9	134.0 [*] , 77.0	20	14	21	MEHP- ¹³ C ₂
MEOHP	4.96	291.0	121.0 [*] , 143.0	30	16	21	MEOHP- ¹³ C ₄
MEP	4.37	192.9	77.0 [*] , 121.0	14	17	11	MEP- ¹³ C ₂
MMP	3.31	179.1	77.0 [*] , 107.0	15	16	12	MMP- ¹³ C ₂
MNBP	5.02	221.1	76.9 [*] , 71.0	21	17	28	MNBP- ¹³ C ₂
MNP	6.95	291.1	140.9 [*] , 77.0	13	26	11	MNP-D ₄
MOP	6.90	277.1	77.0 [*] , 127.0	22	22	11	MOP- ¹³ C ₂
TMP-D ₉	4.49	150.1	115.0	-26	-20	-21	/
TnPP-D ₂₁	7.16	246.1	102.0	-16	-20	-19	/
TnBP-D ₂₇	8.93	294.2	102.0	-21	-22	-19	/
TPHP-D ₁₅	8.31	342.1	82.1	-22	-46	-15	/
TCEP-D ₁₂	5.88	297.1	102.1	-18	-23	-19	/
TCiPP-D ₁₈	7.19	345.1	102.0	-21	-22	-19	/
TDCPP-D ₁₅	8.23	446.1	102.0	-28	-28	-18	/
TBOEP-D ₂₇	9.25	426.4	208.0	-14	-17	-22	/
V6-D ₁₆	7.32	598.9	369.0	-38	-20	-26	/
TDBPP-D ₁₅	8.65	713.6	102.0	-24	-28	-18	/
BBOEHEP-D ₄	7.14	347.0	247.0	-23	-12	-17	/
BCEP-D ₈	4.31	231.0	67.1	-16	-21	-27	/
DPHP-D ₁₀	5.02	259.0	98.0	23	19	28	/

表 2 (续)
Table 2 (Continued)

Compound	Retention time/min	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Q1/V	CE/V	Q3/V	IS
BBOEP-D ₈	5.90	305.0	79.0	22	27	12	/
MBZP- ¹³ C ₂	4.96	259.0	76.9	13	17	12	/
MCHP- ¹³ C ₂	5.20	251.1	79.0	13	17	13	/
MDP-D ₄	6.72	309.1	81.2	19	14	13	/
MEHHP- ¹³ C ₄	5.08	297.1	124.2	20	22	12	/
MEHP- ¹³ C ₂	5.26	281.0	136.9	20	22	12	/
MEOHP- ¹³ C ₄	3.37	295.2	123.9	13	27	12	/
MEP- ¹³ C ₂	4.55	197.0	79.0	15	17	12	/
MMP- ¹³ C ₂	7.80	183.0	79.0	24	23	13	/
MNBP- ¹³ C ₂	6.96	225.0	79.0	13	27	12	/
MNP-D ₄	4.96	295.1	79.2	18	17	12	/
MOP- ¹³ C ₂	6.91	280.9	127.0	10	15	13	/

* Quantitative ion pair; /: no value.

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

本研究考察了 3 种色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC® BEH C18 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 和 Kinetex F5 (100 mm×3.0 mm, 2.6 μm) 对 33 种目标化合物的分离效果。实验表明, 使用 100 mm BEH C18 色谱柱时, MEHP 和 MOP 这对同分异构体未能实现完全分离; 150 mm 的 BEH C18 色谱柱在相同仪器条件下, 33 种目标化合物均具有较满意的峰形与响应, MEHP 和 MOP 这对同分异构实现完全分离, 且在 15 min 内 33 种目标化合物可全部出峰 (见图 1); 使用 Kinetex F5 柱时, OH-TBOEP、BBOEP、MEOHP 等化合物的色谱峰出现峰形拖尾, 且 mPAEs 的响应普遍比 BEH C18 色谱柱降低 50%, 同时, 由于 Kinetex F5 柱的偶极和 π - π 作用,

目标化合物分析时间延长至 25 min。因此选择 ACQUITY UPLC® BEH C18 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱作为分析柱。

对流动相进行优化, 在超纯水作为水相的条件下, 所有 33 种目标化合物在甲醇中的响应值均高于乙腈, 尤其对于大多数 OPEs 和 mOPEs 影响较大, 故本研究选择甲醇作为流动相。进一步对水相进行优化, 选择 0.5 mmol/L 乙酸铵水溶液和 0.1% 乙酸水溶液两种流动相, 结果表明, 当水相为 0.5 mmol/L 乙酸铵水溶液时, 多数 OPEs 和 mOPEs 的响应比 0.1% 乙酸水溶液高 3~4 倍, 多数 mPAEs 的响应比 0.1% 乙酸水溶液降低 10%~20%, 说明 0.1% 的乙酸对多数 OPEs 和 mOPEs 的电离有抑制作用, 对 mPAEs 有促进作用。为提高 mPAEs 的响应且不影响 OPEs 和 mOPEs 的响应, 选择向 0.5 mmol/L 乙酸铵中加入不同含量 (0.1%、0.05% 和 0.02%) 的乙酸, 结果表明即使 0.5 mmol/L 乙酸铵中

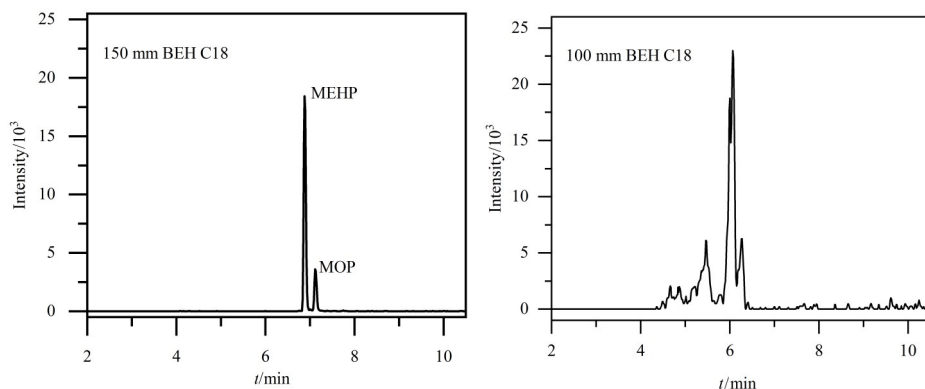


图 1 不同长度 BEH C18 色谱柱对 MEHP 和 MOP 的分离效果

Fig. 1 Separation of MEHP and MOP on BEH C18 column with different lengths

仅含有0.02%的乙酸,多数OPEs和mOPEs的响应仍然降低了50%~75%,且mPAEs响应仅提升10%~20%,故选择放弃加入乙酸。继续比较不同乙酸铵浓度(0.05、0.1、0.5、1.0 mmol/L)对化合物响应的影响,结果表明0.05和0.1 mmol/L的乙酸铵会降低OPEs和mOPEs的响应,对mPAEs响应影响不明显,1.0 mmol/L的乙酸铵对目标化合物响应影响不明显,但会显著增大基线噪声,影响方法的灵敏度,综合以上结果,本研究最终选择0.5 mmol/L乙酸铵-甲醇作为流动相。在1.4节条件下,33种目标化合物的总离子流图见图2,可以看出,33种目标化合物的色谱峰形和响应强度均较为理想。

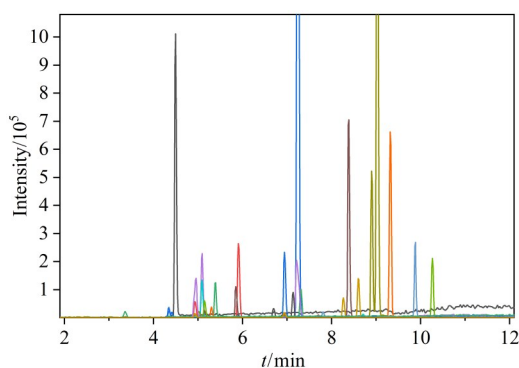


图2 33种目标化合物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of the 33 target compounds

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂

实验比较了不同溶剂的提取效率,通过在全血样品中加标20 ng/mL(终质量浓度),分别采用5种提取溶剂(乙腈、甲醇、乙腈-甲醇(1:1)、0.1%甲酸乙腈、0.5%甲酸乙腈)进行提取,不经过固相萃取柱处理,其余按照1.3节处理,计算回收率。采用乙腈为提取溶剂时,TCEP、MEP、MMP、BBOEP的回收不理想,回收率分别为204.62%、13.24%、197.83%、159.95%;采用甲醇提取时,TMP和BCEP未出峰,OH-TBOEP的回收达到187.15%;提取溶液为乙腈-甲醇(1:1)时,TMP和BCEP未出峰,DPHP回收率低于10%;提取溶液为0.1%甲酸乙腈时,33种目标化合物的回收率均在60.48%~137.37%;提取溶液为0.5%甲酸乙腈时,MEOHP的回收率为188.86%,MMP-¹³C₂未出峰。此外,当提取溶液中存在乙腈时,形成的沉淀为大粒径固体沉淀物,甲醇则形成松散的絮凝沉淀物,离心后,其絮状沉淀物易悬浮。综上,本研究最终选择0.1%甲酸乙腈为提取溶剂。

2.2.2 固相萃取柱

考察了3种固相萃取柱:HMR S-micro BIO 96孔SPE(A)、Anavo HLB-Prime SPE(6 mL, 300 mg)(玻璃)(B)和Oasis HLB-Prime SPE(3 mL, 150 mg)(塑料)(C)。在全血样品中加标20 ng/mL(终质量浓度),按照1.3节操作,计算目标化合物的回收率。结果表明,选择A时,33种目标化合物的回收率为67.89%~130.14%;选择B时,TMP、TDBPP、BCEP未出峰,TnPP的回收率为20.63%,DNBP、BEHP的回收率达到200%;选择C时,TnPP的回收率为23.92%,OH-TBOEP的回收率为173.24%,BCEP未出峰。由结果可知,HMR S-micro BIO 96孔柱满足“生物样品定量分析方法验证指导原则”的要求,最终选择HMR S-micro BIO 96孔SPE。

TnPP在2.2.1节中使用不同提取溶剂提取但不经过SPE净化,其回收率在77.46%~125.51%,经过HLB柱净化后其回收率均显著降低,但是其同分异构体TiPP未出现此情况,可能的原因是TnPP是直链结构,空间位阻小,其分子结构中P=O键易与HLB柱硅胶表面的硅羟基发生相互作用,继而影响其回收率,而HMR S-micro BIO 96孔SPE小柱填料为无机聚合物,可避免TnPP的损失。

2.2.3 提取液体积

考察了不同体积(0.2、0.4、1.0、2.0、3.0 mL)0.1%甲酸乙腈提取溶剂对实验的影响。在全血样品中加标20 ng/mL(终质量浓度),按照1.3节操作,计算目标化合物的回收率。当提取溶剂过少时(0.2、0.4和1.0 mL),全血样品中的蛋白质等大分子物质未沉淀完全,会堵塞SPE柱,在后续仪器检测过程中影响基线平衡,导致噪声增大;当提取溶剂为3 mL时,由于沉淀速度过快,与高血浆蛋白结合的分析物会发生共沉淀,影响回收率,如mPAEs回收率普遍偏低(<60%)。故本研究最终选择提取液体积为2.0 mL。

2.2.4 污染控制

预实验结果表明,TCEP、TCiPP、TPHP、TiBP和TnBP存在较明显的背景干扰。文献[26]报道,在混合器与自动进样器之间连接捕集柱可有效降低流动相中的背景干扰。基于此,本研究选用了Ghost Trap DS-HP色谱柱(30 mm×2.1 mm)作为捕集柱。在0.5 mmol/L乙酸铵-甲醇流动相条件下,安装捕集柱后,背景干扰中TCiPP的响应强度

较未安装前下降 94.7%,其余残留背景干扰亦得到有效消除。

前处理过程中易引入 OPEs 及 mOPEs 等背景干扰,因此需对所有试剂与耗材进行本底筛查。本实验所用试剂(包括超纯水)均选用质谱级,以最大程度降低试剂引入的背景干扰。由于塑料材质(包括聚丙烯)可能带来污染,建议实验过程中尽量避免使用。本实验除 0.22 μm 滤头为聚四氟乙烯(PTFE)材质外,其余耗材均采用玻璃材质,具体包括 10 mL 玻璃离心管、1 mL 玻璃加样枪头、玻璃注射器、玻璃滴管、微量注射器及玻璃内衬管等。所有玻璃耗材在使用前均以锡箔纸包裹,置于 400 $^{\circ}\text{C}$ 马弗炉中煅烧 4 h,冷却后备用。该方法可有效降低 TiBP 和 TnBP 等目标物的污染风险。

对于实验过程中不可避免需使用的塑料制品:PTFE 滤头和 96 孔 SPE,均采用乙腈进行预处理以降低背景干扰。背景干扰检测结果表明:PTFE 滤头经 1 mL 乙腈清洗一次后,可有效降低 TiBP 和 TnBP 含量;96 孔 SPE 经 2 mL 乙腈清洗一次后,可显著降低 TiBP、TnBP、MEHP 和 MNBP 含量。

为控制仪器残留,本方法在每针进样前后均增加了洗针步骤,并将洗针液更换为强洗液体系(甲醇-乙腈-异丙醇-水,体积比为 1:1:1:1)。在高浓度样品进样后,额外进样 0.1% 甲酸乙腈以确保无残留。此外,每批样品分析过程中均穿插进样标准溶液,用于实时校正保留时间。

实验过程中发现,TMP 加标全血样品在放置半个月后出现双峰现象,且响应强度下降 64.6%。推测其原因可能是 TMP 相对分子质量较小、亲水性较强并具有一定挥发性,其酯键在储存过程中发生降解,生成磷酸二甲酯(DMP),从而导致色谱图中出现 TMP 与 DMP 两个色谱峰,见图 3。因此,建

议混合标准工作液现配现用,以保证分析结果的准确性。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性范围、方法检出限及定量限

采用本方法对系列质量浓度的混合标准工作液进行 LC-MS/MS 分析。以目标化合物质量浓度与对应同位素内标质量浓度之比为横坐标,目标化合物的峰面积与对应同位素内标峰面积之比为纵坐标,绘制标准曲线。结果显示,33 种目标化合物线性关系良好,相关系数(r)为 0.993 3~0.999 8。按照 3 倍信噪比(S/N)计算检出限(LOD),按照 10 倍 S/N 计算定量限(LOQ)。相关数据见表 3。

2.3.2 回收率与精密度

在空白全血样本中加入不同水平(5、20、40 ng/mL)的混合标准溶液,按 1.3 节和 1.4 节操作处理,以考察方法的准确度与精密度。每个加标水平设置 6 个平行样,同时设置过程空白和全血空白,进样 6 针即穿插检测过程空白和全血空白,以保证方法的准确性。结果表明,33 种目标化合物的加标回收率为 60.5%~138.3%,相对标准偏差(RSD)为 1.6%~11.0%,见表 4。

值得注意的是,部分化合物的回收率超出常规可接受范围(80%~120%),如 TMP 回收率偏低,原因可能是在前处理过程中部分降解为 DMP;TCiPP 回收率偏低的主要原因在于其疏水特性($\log P$ 约为 1.5~2.0),易在进样系统中发生不可逆吸附。部分 mPAEs 如 MEHP、MEOHP 和 MEP 的高浓度加标回收率大于 100%,这类单酯类化合物通常含有羧基,在负离子模式下其电离行为对微环境变化较为敏感,人全血共萃取的物质可能会加大 MEHP、MEOHP 和 MEP 的质子转移效率,导致其回收率偏高。然而,该方法在所有浓度水平下对这些化合物

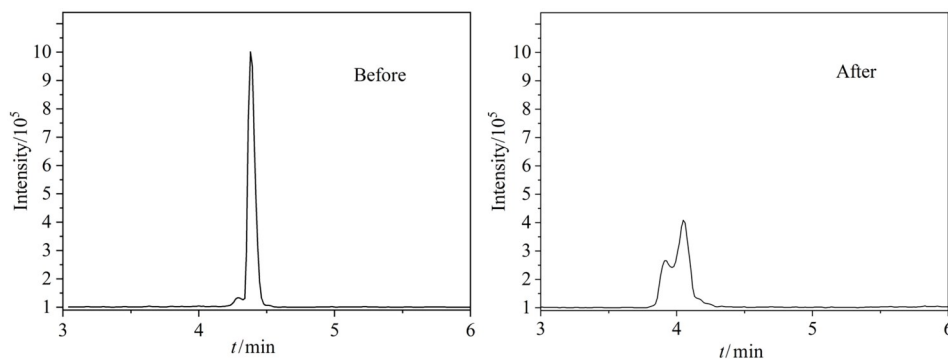


图 3 全血中 TMP(1.0 ng/mL)放置 15 天前后的色谱图变化

Fig. 3 Changes in chromatograms of TMP(1.0 ng/mL) in whole blood before and after 15 days of storage

表3 33种目标化合物的线性回归方程、相关系数、检出限及定量限
Table 3 Linear regression equations, correlation coefficients (*r*), limits of detection and limits of quantification of the 33 target compounds

Compound	Regression equation	<i>r</i>	LOD/ (ng/mL)	LOQ/ (ng/mL)
TMP	$Y=0.37X+1.1160$	0.9981	0.04	0.14
TCEP	$Y=0.13X+0.2328$	0.9998	0.03	0.09
TiPP	$Y=0.16X+0.0144$	0.9995	0.01	0.03
TnPP	$Y=0.01X+0.0011$	0.9998	0.17	0.56
V6	$Y=0.43X+0.0123$	0.9997	0.01	0.05
TCiPP	$Y=0.27X+2.4939$	0.9982	0.04	0.15
TDCiPP	$Y=0.05X-0.00387$	0.9995	0.02	0.07
TDBPP	$Y=0.34X+0.0469$	0.9985	0.03	0.11
TPHP	$Y=0.15X+0.0472$	0.9998	0.01	0.03
TiBP	$Y=0.21X-0.0155$	0.9993	0.01	0.02
TnBP	$Y=0.02X+0.0058$	0.9978	0.08	0.28
TBOEP	$Y=0.31X+0.0028$	0.9983	0.003	0.01
TMPP	$Y=0.13X-0.0205$	0.9988	0.01	0.04
EHDPP	$Y=0.18X-0.0074$	0.9990	0.01	0.02
BBOEHEP	$Y=0.45X-0.0352$	0.9995	0.01	0.03
OH-TBOEP	$Y=0.096X+0.0017$	0.9987	0.22	0.74
BCEP	$Y=0.046X+0.0045$	0.9998	0.31	1.02
DNBP	$Y=0.03X+0.0055$	0.9933	0.07	0.25
DPHP	$Y=0.063X+0.0083$	0.9989	0.05	0.16
BEHP	$Y=0.028X-0.00049$	0.9996	0.06	0.19
BCiPP	$Y=0.05X-0.0014$	0.9997	0.06	0.20
BBOEP	$Y=0.093X+0.0023$	0.9998	0.05	0.15
MBZP	$Y=0.081X+0.0150$	0.9976	0.15	0.50
MCHP	$Y=0.094X-0.0047$	0.9996	0.11	0.37
MDP	$Y=0.038X-0.0061$	0.9942	0.12	0.38
MEHHP	$Y=0.11X+0.0066$	0.9983	0.03	0.10
MEHP	$Y=0.050X+0.02161$	0.9986	0.02	0.06
MEOHP	$Y=0.063X-0.0132$	0.9968	0.10	0.35
MEP	$Y=0.070X+0.0360$	0.9951	0.09	0.30
MMP	$Y=0.11X+0.1109$	0.9980	0.03	0.11
MNBP	$Y=0.48X+0.0381$	0.9991	0.02	0.08
MNP	$Y=0.059X+0.0064$	0.9954	0.13	0.43
MOP	$Y=0.092X+0.0113$	0.9996	0.04	0.14

Y: peak area ratio of target compound to IS; X: mass concentration ratio of target compound to IS; linear range: 0.1–50 ng/mL.

均展现出良好的精密度(RSD<11%),证明其用于定量的可靠性。TCEP、TnBP、EHDPP 和 BCiPP 的 RSD 大于 10%,其中,EHDPP 和 BCiPP 未找到对应的同位素内标进行校正,而是分别用 TPHP-D₁₅ 和 DPHP-D₁₀ 作为同位素内标,这可能是其 RSD 大于 10% 的原因;TCEP 和 TnBP 展现出良好的回收率(88.9%~118.5%)和相关性($r>0.993\ 3$),证明了定

表4 33种目标化合物的加标回收率和相对标准偏差(*n*=6)
Table 4 Spiked recoveries and RSDs of the 33 target compounds (*n*=6)

Compound	5 ng/mL		20 ng/mL		40 ng/mL	
	Recov- ery/%	RSD /%	Recov- ery/%	RSD/ %	Recov- ery/%	RSD/ %
TMP	64.4	6.6	68.4	7.7	75.1	2.4
TCEP	109.7	2.6	104.1	5.7	118.5	10.1
TiPP	105.6	3.0	110.3	9.0	111.7	4.0
TnPP	77.5	7.8	83.8	6.4	104.8	6.5
V6	101.6	3.2	113.8	1.8	122.3	2.1
TCiPP	68.5	1.8	66.7	3.6	61.4	3.5
TDCiPP	118.7	5.4	104.5	7.5	94.1	7.3
TDBPP	85.1	9.1	92.6	5.6	107.3	5.9
TPHP	97.2	2.3	97.2	9.3	111.4	9.4
TiBP	71.2	5.6	81.4	2.9	80.3	2.7
TnBP	88.9	4.6	105.1	10.7	109.0	10.6
TBOEP	112.4	8.9	112.3	4.5	129.0	4.1
TMPP	86.0	6.7	81.4	8.0	91.5	8.8
EHDPP	83.9	11.0	77.7	6.9	93.3	6.8
BBOEHEP	88.9	1.6	105.4	1.9	79.9	2.4
OH-TBOEP	126.8	9.6	117.8	3.8	127.9	3.3
BCEP	110.5	7.2	138.3	7.4	103.6	7.1
DNBP	79.7	5.0	87.4	5.8	87.9	5.3
DPHP	120.6	4.0	73.6	3.9	68.5	9.2
BEHP	95.3	2.8	123.0	2.2	121.7	2.1
BCiPP	68.7	10.0	60.5	10.9	77.7	10.8
BBOEP	103.0	4.3	97.6	4.2	100.6	4.4
MBZP	97.5	8.6	91.7	5.4	97.1	2.7
MCHP	119.9	6.1	114.2	4.3	109.1	6.3
MDP	76.7	8.7	94.0	2.0	79.1	2.5
MEHHP	114.5	3.4	104.4	2.7	105.2	3.1
MEHP	93.6	7.9	111.3	4.3	121.8	7.0
MEOHP	118.6	5.2	129.9	2.8	128.3	5.5
MEP	84.3	3.8	78.2	4.2	123.8	5.9
MMP	89.9	2.5	97.0	2.6	112.1	2.0
MNBP	106.9	5.1	112.1	4.3	114.1	3.4
MNP	92.5	4.9	83.8	4.8	108.7	4.7
MOP	103.9	6.4	124.0	3.1	102.3	2.1

量的可靠性。

2.4 实际样品的测定

为验证方法的实用性,收集 14 份人全血样本,按照本研究方法开展目标化合物检测。检测结果表明,在 14 份样本中 TCiPP、TPHP、EHDPP、MEHHP、MNBP 和 MOP 的检出率为 100%,TPHP 的检出量最高(10.04 ng/mL),具体见表 5。Guo 等^[27]研究表明,在越南河内、归洲和日本神奈川地区的母乳中 TPHP 是首要成分。Sundkvist 等^[28]在

表 5 人体全血样本中目标化合物的测定结果($n=14$)
Table 5 Determination results of the target compounds in human whole blood samples ($n=14$)

Compound	Detection rate/%	Median/(ng/mL)	Maximum/(ng/mL)	IQR/(ng/mL)
TMP	-	-	-	-
TCEP	-	-	-	-
TiPP	85.7	0.42	0.67	0.21
TnPP	-	-	-	-
V6	-	-	-	-
TCiPP	100	0.57	0.95	0.24
TDCiPP	71.4	0.29	2.02	0.54
TDBPP	-	-	-	-
TPHP	100	2.14	10.04	6.07
TiBP	-	-	-	-
TnBP	14.3	-	0.55	0.23
TBOEP	50	1.44	1.99	0.58
TMPP	-	-	-	-
EHDPP	100	0.13	0.57	0.15
BBOEHEP	-	-	-	-
OH-TBOEP	-	-	-	-
BCEP	92.9	0.2	0.72	0.14
DNBP	14.3	-	0.58	0.11
DPHP	92.9	0.051	0.43	0.30
BEHP	28.6	-	1.74	0.39
BCiPP	-	-	-	-
BBOEP	71.4	0.28	0.89	0.3
MBZP	-	-	-	-
MCHP	78.6	0.62	1.86	0.76
MDP	-	-	-	-
MEHHP	100	0.15	0.75	0.21
MEHP	92.9	0.62	1.77	0.6
MEOHP	92.9	0.11	3.47	2.38
MEP	92.9	0.902	3.24	1.62
MMP	-	-	-	-
MNBP	100	0.24	0.32	0.38
MNP	78.6	0.21	1.03	0.87
MOP	100	0.52	0.73	0.13

-: <LOD; IQR: interquartile range.

瑞典母乳样本中检测到 TCiPP 是 OPEs 污染主要成分。MEHHP 是邻苯二甲酸二-2-乙基己酯 (DEHP) 的代谢产物之一, DEHP 作为商业上主要使用的邻苯二甲酸酯^[29], 主要应用于聚氯乙烯。本研究中 MEHHP、MNBP 的中位数质量浓度分别为 0.15 和 0.24 ng/mL, 与 Högberg 等^[29]对瑞典 36 名女性血清的检测结果 (MEHHP、MNBP 中位数质量浓度均为 0.5 ng/mL) 类似。

同时, 尿液作为 OPEs 和 PAEs 的首选样本, 虽

然易受饮食、代谢等方面的影响, 但因其无损伤采样, 仍是人体生物监测研究的首选样本。邻苯二甲酸二异辛酯 (DEP) 来自化妆品和个人护理产品, 是人体接触的最主要的 PAEs, DEP 体内代谢产物为 MEP, 在本研究中 MEP 的检出率为 92.9%。mPAEs 在人体尿液中的浓度通常比脂质富集部位 (如乳房组织等) 高出 5~20 倍。例如, Högberg 等^[29]报道尿液中 MEHP、MIBP、MEP 和 MNBP 的浓度是血液或乳汁中的 20~100 倍。德国巴伐利亚北部地区的尿液样本显示, 尿液中 MBP、MEP、MEHHP 和 MEOHP 的中位质量浓度分别为 181、90.2、46.8 和 36.5 ng/mL^[31]。Hu 等^[32]报道中国柳州青少年 (6~18 岁) 尿液中 TCEP、BCiPP 和 DPHP 的中位质量浓度分别为 0.28、0.35 和 0.24 ng/mL, 高于本研究中全血的浓度。OPEs 和 PAEs 对人类健康的潜在风险已成为学界关注的焦点。然而, 关于其在环境中的存在状况、人体暴露途径及相应的健康风险, 我们的认知尚不充分。本研究建立的分析方法可为准确评估人体对该类污染物的暴露水平及其健康风险提供可靠的技术支撑。

3 结论

本研究将高通量的 HMR S-micro BIO 96 孔固相萃取板与 UPLC-MS/MS 技术结合, 建立了一种可同时测定人体全血中 22 种 OPEs、mOPEs 和 11 种 mPAEs 的方法。该方法具有操作简便、快速的特点, 同时具备高灵敏度、良好的准确度与精密度, 可应用于大批量实际全血样品的检测, 能为全面评估人体内新型污染物 OPEs 和 PAEs 的暴露情况与健康风险提供方法学支持。

参考文献:

- [1] Aimuzi R, Dong C, Xie Z, et al. J Expo Sci Env Epid, 2023, 34(2): 260
- [2] Li Z, Wu D, Guo Y, et al. Sci Total Environ, 2022, 824: 153792
- [3] Du Z, Wei X, Hu X, et al. Anal Methods, 2024, 16(26): 4291
- [4] Bo Y, Zhu Y. Chemosphere, 2022, 301: 134669
- [5] Chai H, Hu W, Dai Y, et al. Frontiers Public Heal, 2022, 10: 995649
- [6] Greaves A K, Su G, Letcher R J. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 308: 59
- [7] Su G, Crump D, Letcher R J, et al. Environ Sci Technol, 2014, 48(22): 13511
- [8] Xu W, Zhang W, Yu Z, et al. Environ Int, 2024, 193:

- 109114
- [9] Domínguez Romero E, Scheringer M. *Drug Metab Rev*, 2019, 51(3): 314
- [10] Lee G, Kim S, Kho Y, et al. *Sci Total Environ*, 2020, 711: 134822
- [11] Meshref S, Li Y, Feng Y L. *J Chromatogr A*, 2020, 1634: 461691
- [12] Zhang Y J, Guo J L, Xue J C, et al. *Environ Pollut*, 2021, 291: 118106
- [13] Cai W, Yang J, Liu Y, et al. *Int J Env Res Pub He*, 2019, 16(19): 3678
- [14] Frederiksen H, Jørgensen N, Andersson A M. *J Anal Toxicol*, 2010, 34: 400
- [15] Guo X, Mu T, Xian Y, et al. *Food Chem*, 2016, 196: 673
- [16] Hou M, Shi Y, Jin Q, et al. *Environ Int*, 2020, 139: 105698
- [17] Li W, Wang Y, Asimakopoulos A G, et al. *Environ Int*, 2019, 133: 105178
- [18] Milton S G, Tejiram R A, Joglekar R, et al. *Int J Env Res Pub He*, 2023, 20(16): 6589
- [19] Kashyap D, Agarwal T. *Sci Total Environ*, 2018, 635: 817
- [20] Sührling R, Wolschke H, Diamond M L, et al. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(13): 6644
- [21] Schmidt N, Castro-Jiménez J, Fauvelle V, et al. *Environ Pollut*, 2020, 257: 113637
- [22] Wang M, Zhang H, Han L. *Water Environ Res*, 2025, 97(4): 70067
- [23] Cui K, Wen J, Zeng F, et al. *Chemosphere*, 2017, 175: 514
- [24] Wang X, Chen P, Zhao L, et al. *Environ Sci Technol*, 2021, 55(5): 3091
- [25] Liu Y, Li Y, Xiao N, et al. *Chemosphere*, 2023, 337: 139237
- [26] Yue Y X, Bian Y T, Cheng Y F, et al. *Chinese Journal of Chromatography*, 2025, 43(9): 1005
岳莹晓, 边雅婷, 成鱼帆, 等. 色谱, 2025, 43(9):1005
- [27] Guo Y, Liang C, Zeng M X, et al. *Sci Total Environ*, 2022, 848: 157669
- [28] Sundkvist A M, Olofsson U, Haglund P, et al. *J Environ Monit*, 2010, 12: 943
- [29] Frederiksen H, Skakkebaek N E, Andersson A M, et al. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51: 899
- [30] Högberg J, Hanberg A, Berglund M, et al. *Environ Health Perspect*, 2008, 116: 334
- [31] Koch H M, Drexler H, Angerer J, et al. *Int J Hyg Envir Heal*, 2003, 206: 77
- [32] Hu L, Yu M, Li Y, et al. *Environ Pollut*, 2022, 295: 118685