

# 固相支撑液液萃取结合超高效液相色谱 - 串联质谱法测定尿中 18 种邻苯二甲酸酯代谢物

张艳, 曲良娇, 凌莉, 吴和岩

珠海市疾病预防控制中心理化检验所, 广东 珠海 519060

**摘要:**目的 基于固相支撑液液萃取(SLE)技术,采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立尿液中18种邻苯二甲酸酯(PAEs)代谢物的测定方法。方法 尿样中加入内标,经过酶解、SLE小柱净化后,采用BEH C18色谱柱色谱分离,在负离子多反应监测模式下检测,内标法定量。结果 18种PAEs代谢物在0.10~80 ng/ml范围内线性关系良好,相关系数均大于0.999。18种PAEs代谢物的平均回收率为84.0%~113.0%,相对标准偏差范围为1.1%~9.5%,方法检出限为0.001~0.07 ng/ml,定量限为0.002~0.2 ng/ml,日内和日间的精密度分别为1.3%~7.0%和1.0%~8.1%。应用该方法对160份尿样进行检测,除3种PAEs代谢物未检出外,其余15种PAEs代谢物的检出率在1.9%~100%之间,8种PAEs代谢物的检出率为100%,其中邻苯二甲酸单丁酯的浓度最高,中位值为126 ng/ml。结论 该方法简便、灵敏、准确,适用于批量尿样中18种PAEs代谢物的检测。

**关键词:**邻苯二甲酸酯代谢物;尿;固相支撑液液萃取(SLE);UPLC-MS/MS

中图分类号:R-33 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2025)02-328-08

DOI:10.20043/j.cnki.MPM.202410288

## Determination of 18 phthalate esters metabolites in urine by solid - phase supported liquid - liquid extraction coupled with ultra - high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry

ZHANG Yan, QU Liang - jiao, LING Li, WU He - yan

Department of Physical and chemical Test, Zhuhai Center for Disease Control and Prevention,

Zhuhai, Guangdong 519060, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the determination of 18 phthalates (PAEs) metabolites in urine by ultra - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC - MS/MS) based on solid - phase support liquid - liquid extraction (SLE) technology. **Methods** Urine sample spiked with internal standards was first hydrolyzed by enzyme, then purified on a SLE column. The separation was performed on a BEH C18 column. The detection was performed in multi - reaction monitoring scan under negative mode. Internal standard method was applied for quantitative analysis. **Results** The 18 PAEs metabolites showed good linear relationships in the range of 0.10 - 80 ng/ml ( $r > 0.999$ ). The average recoveries of 18 PAEs metabolites ranged from 84.0% - 113.0% with relative standard deviations between 1.1% and 9.5%. The limits of detection and quantitation of the method were 0.001 - 0.07 ng/ml and 0.002 - 0.2 ng/ml, respectively. The intra - day and the inter - day precisions were 1.3% - 7.0% and 1.0% - 8.1%, respectively. 160 urine samples were analyzed with this method. Except for 3 PAEs metabolites that were not detected, the detection rates of the remaining 15 PAEs metabolites ranged from 1.9% to 100%, and the detection rates of 8 PAEs metabolites were 100%. Among them, mono - n - butyl phthalate had the highest concentrations with a median concentration of 126 ng/ml. **Conclusion** This method is simple, sensitive, and accurate, and it is suitable for the determination of 18 PAEs metabolites in large batches of urine samples.

**Keywords:** Phthalate esters metabolites; Urine; Solid - phase supported liquid - liquid extraction (SLE); UPLC - MS/MS

邻苯二甲酸酯(PAEs)为人工合成化合物,主要用作聚氯乙烯材料的增塑剂,以提高塑料产品可塑

性、柔韧性和强度,被广泛应用于玩具、食品包装材料、个人护理产品、医疗器械等产品中。由于PAEs和塑料分子之间通常以分子间相互作用力结合,极易释放到环境中。据报道,在水、食物、室内空气、沉积物、生物样品等各种环境介质中均可检测到PAEs<sup>[1-7]</sup>。PAEs是潜在的内分泌干扰物和生殖毒物,研究表明,

基金项目:珠海市社会发展领域科技计划项目(2220004000115)

作者简介:张艳(1982—),女,博士,主任技师,研究方向:理化检验

通信作者:张艳, E-mail:21399831@qq.com

人类接触或摄入 PAEs 会对其生殖、发育和免疫力产生不利影响<sup>[8-10]</sup>。PAEs 的毒性作用正日益引起公众的关注。PAEs 进入人体后,很快代谢为 PAEs 的单酯、羟基化或氧化产物,以及葡萄糖醛酸结合型代谢产物,进一步从尿液中排出。由于尿液检测结果可以反映多种暴露途径的综合影响,一般以测定尿中 PAEs 代谢物含量的方式来评估 PAEs 在人体内的负荷水平。然而,目前尚无尿液中 PAEs 代谢物检测的国标方法,涉及人体 PAEs 暴露的研究也不多。

目前,对于 PAEs 代谢物的研究主要集中在检测方法和前处理技术两方面。其检测技术主要有气相色谱质谱联用法<sup>[11-12]</sup>和液相色谱质谱联用法<sup>[13-17]</sup>。前者通常需要衍生化,步骤繁琐,且衍生试剂毒性大,不适于大批量样品的检测。而后者因其具有分离能力强,灵敏度高、特异性强等优点,是目前生物监测中应用最广泛的检测技术。对于尿液样品中 PAEs 代谢物的提取净化,最常用的方法是固相萃取(SPE)法<sup>[12-14]</sup>,此外,石飞云等人<sup>[15]</sup>提出了将尿液酶解后直接用乙腈定容,冷冻除杂后过膜测定的方法,Alves rocha 等人<sup>[16]</sup>提出了基于空气辅助液-液微萃取的尿样制备程序。

固相支撑液液萃取(SLE)基于传统液液萃取(LLE)的工作原理,利用特殊处理过的多孔吸附剂如硅藻土作为填料,水性样本吸附于填料微孔中形成面积很大的液膜,当与水不混溶溶剂流经填料空隙时,溶剂与样本之间形成连续的浓度差,使目标物被高效萃取到溶剂中,实现对目标物的富集与净化。相较于 SPE, SLE 省去了活化和淋洗步骤,操作更简便,处理样品时,只需上样、静置和洗脱三个步骤即可完成目标分析物的提取和净化。该法消除了 LLE 中常见的相分离不完全和乳化问题。总体而言, SLE 操作简便,易于自动化,是实现实验室高通量、高质量样本处理的有力工具,近年来在生物分析领域得到了广泛的关注和应用<sup>[17-19]</sup>。

本文采用 SLE 技术,通过优化萃取、洗脱流程及参数,开发了一种适用于尿液样本的前处理方法,结合 UPLC-MS/MS,建立了尿液中 18 种 PAEs 代谢物的测定方法。该方法操作简单高效,重复性好,准确度高,实现了多种同分异构体的有效分离,适用于大批量尿样中 PAEs 代谢物的生物监测。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** Acquity UPLC-I-Class-Plus 型超高效液相色谱仪(Waters, 美国); Triple Quad 6500 + 三重四级杆串联质谱仪(AB SCIEX, 美国); Extrahera 全自动样品前处理系统(Biotage, 瑞典);

TurboVap 多功能全自动样品浓缩仪(Biotage, 瑞典); Acquity UPLC BEH 色谱柱, 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm(Waters, 美国); ISOLUTE SLE 1 mL 柱(北京绿棉科技有限公司); 电热恒温水浴锅(美墨尔特, 德国); Milli-Q Advantage A10 纯水机(Millipore, 美国); 涡旋振荡器(IKA, 德国); 电子天平(Sartorius, 德国); 0.22 μm 滤膜(ANPEL, 中国)。

PAEs 代谢物和内标的名称及其缩写见表 1, 邻苯二甲酸单正癸酯(MDP)和邻苯二甲酸单正壬酯(MNP)的标准品为固体, 购自加拿大多伦多 TRC 公司, 其余 PAEs 代谢物和内标均为液体, 浓度为 100 μg/ml, 其中邻苯二甲酸单异癸酯(MiDP)和邻苯二甲酸单正戊酯(MnPeP)购自美国 Accustandard 公司, 其余购自美国剑桥同位素公司。甲醇(MS 级)、乙酸乙酯和乙酸铵(HPLC 级)购自德国 Merck 公司。β-葡萄糖醛酸酶(>100 000 U/ml)和乙酸(分析纯)购自上海安谱实验科技有限公司。人工尿样来自北京汇智泰康医药技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 标准溶液配制** 称取 MDP 和 MNP 标准各 5 mg, 分别用甲醇配制成 100 μg/ml 的单标溶液。分别吸取 18 种 PAEs 代谢物单标溶液各 0.50 ml, 用甲醇配制成 5.0 μg/ml 的 PAEs 混合标准储备液。取各 PAEs 代谢物的内标 0.50 ml, 甲醇稀释定容至 10ml, 配制成 5.0 μg/ml 的内标混标储备液。取适量 PAEs 代谢物的混合标准储备液, 用甲醇-水溶液(1:1, v/v)配制成浓度分别为 0.10、0.50、2.0、5.0、10、20、40、80 ng/ml 的标准系列, 其中内标的添加浓度为 10 ng/ml。

**1.2.2 样品前处理** 采集的尿样于 -80 °C 冰箱保存, 使用时先将尿样置于 4 °C 冰箱中解冻过夜, 然后取出放至室温, 涡旋混匀。取 0.50 ml 尿液于玻璃管中, 依次加入 20 μl 内标混标(250 ng/ml)、0.30 ml 乙酸铵缓冲溶液(1 mol/L, pH4.5)、20 μl β-葡萄糖醛酸酶, 涡旋混匀, 置于 37 °C 水浴中避光酶解 2 h, 然后加入 0.80 ml 异丙醇-乙酸乙酯溶液(1:3, v/v), 充分混匀, 待净化。将待净化液加载至 SLE 柱上, 静置 5 min, 同时收集流出液, 加入 5 ml 乙酸乙酯进行洗脱, 合并收集到的流出液和洗脱液, 氮吹浓缩至近干, 用 0.50 ml 甲醇-水(1:1, v/v)溶液复溶, 涡旋振荡, 过 0.22 μm 尼龙滤膜, 待上机检测。

**1.2.3 色谱条件** 流动相 A: 0.05% 乙酸溶液, B: 甲醇。洗脱程序: 0 min, 10% B; 0 ~ 1.5 min, 10% ~ 30% B; 1.5 ~ 14 min, 30% ~ 70% B; 14 ~ 17 min, 70% ~ 95% B; 17 ~ 19 min, 95% B, 19.1 min 回到初始比例。流速 0.3 ml/min, 柱温 40 °C, 进样 5 μl。

**1.2.4 质谱条件** 电喷雾离子源负离子模式; 多反

应监测模式(MRM)扫描;喷雾电压-4 500 V;离子源温度 550 ℃;气帘气 35 psi;喷雾气 55 psi;加热气 55 psi;碰撞气 9 psi。其余质谱参数见表 1。

## 2 结果

### 2.1 质谱条件优化 通过针泵进样,选择全扫描和

产物离子扫描模式,调谐各参数,使目标化合物的母离子、子离子的响应达到最优。18 种 PAEs 代谢物及内标的母离子、定量离子、定性离子、去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)等参数信息见表 1。

表 1 18 种 PAEs 代谢物及内标的质谱参数

Table 1 Mass spectrometric parameters of 18 PAEs metabolites and internal standards

化合物名称 (缩写)	保留时间 (min)	母离子 ( <i>m/z</i> )	子离子 ( <i>m/z</i> )	DP (V)	CE (eV)
邻苯二甲酸单甲酯(MMP)	3.56	179.0	77.0 <sup>a</sup> ,106.9	40	22,15
邻苯二甲酸单乙酯(MEP)	5.03	193.0	77.0 <sup>a</sup> ,121.0	50	22,15
邻苯二甲酸单异丙酯(MiPrP)	6.71	207.1	77.0 <sup>a</sup> ,57.0	45	28,17
邻苯二甲酸单异丁酯(MiBP)	9.07	221.1	77.0 <sup>a</sup> ,71.0	50	25,17
邻苯二甲酸单(2-乙基-5-氧己基)酯(MEOHP)	9.10	291.1	77.0 <sup>a</sup> ,141.0	70	40,22
邻苯二甲酸单正丁酯(MnBP)	9.30	221.1	77.0 <sup>a</sup> ,133.9	50	25,18
邻苯二甲酸单正苯酯(MBzP)	9.55	255.1	77.0 <sup>a</sup> ,105.1	50	30,20
邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羧基戊基)酯(MECP)	9.75	307.0	159.1 <sup>a</sup> ,113.0	40	16,38
邻苯二甲酸单(2-乙基-5-羟基己基)酯(MEHP)	10.08	293.1	145.0 <sup>a</sup> ,120.8	65	19,24
邻苯二甲酸单-(2-羧基甲基己基)酯(MCMHP)	10.73	307.2	158.9 <sup>a</sup> ,113.0	40	18,42
邻苯二甲酸单环己酯(MCHP)	10.96	247.0	97.1 <sup>a</sup> ,77.0	57	19,33
邻苯二甲酸单正戊酯(MnPeP)	11.38	235.0	77.0 <sup>a</sup> ,85.1	55	27,17
邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(MEHP)	15.52	277.1	134.0 <sup>a</sup> ,127.0	60	21,21
邻苯二甲酸单正辛酯(MOP)	15.95	277.1	77.0 <sup>a</sup> ,127.0	60	33,21
邻苯二甲酸单异壬酯(MiNP)	15.96	291.1	77.0 <sup>a</sup> ,141.0	70	32,22
邻苯二甲酸单正壬酯(MNP)	16.63	291.1	141.0 <sup>a</sup> ,77.0	70	22,32
邻苯二甲酸单异癸酯(MiDP)	16.85	305.0	77.0 <sup>a</sup> ,155.0	80	39,23
邻苯二甲酸单正癸酯(MDP)	17.14	305.1	155.0 <sup>a</sup> ,77.0	60	23,29
邻苯二甲酸单甲酯- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	3.54	182.9	79.0 <sup>a</sup>	40	23
邻苯二甲酸单乙酯- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	5.03	197.0	79.0 <sup>a</sup>	40	22
邻苯二甲酸单正丁酯- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	9.30	225.0	79.0 <sup>a</sup>	40	25
邻苯二甲酸单苯酯- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	9.54	259.0	79.0 <sup>a</sup>	40	27
邻苯二甲酸单环己酯- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	10.97	251.0	79.0 <sup>a</sup>	57	25

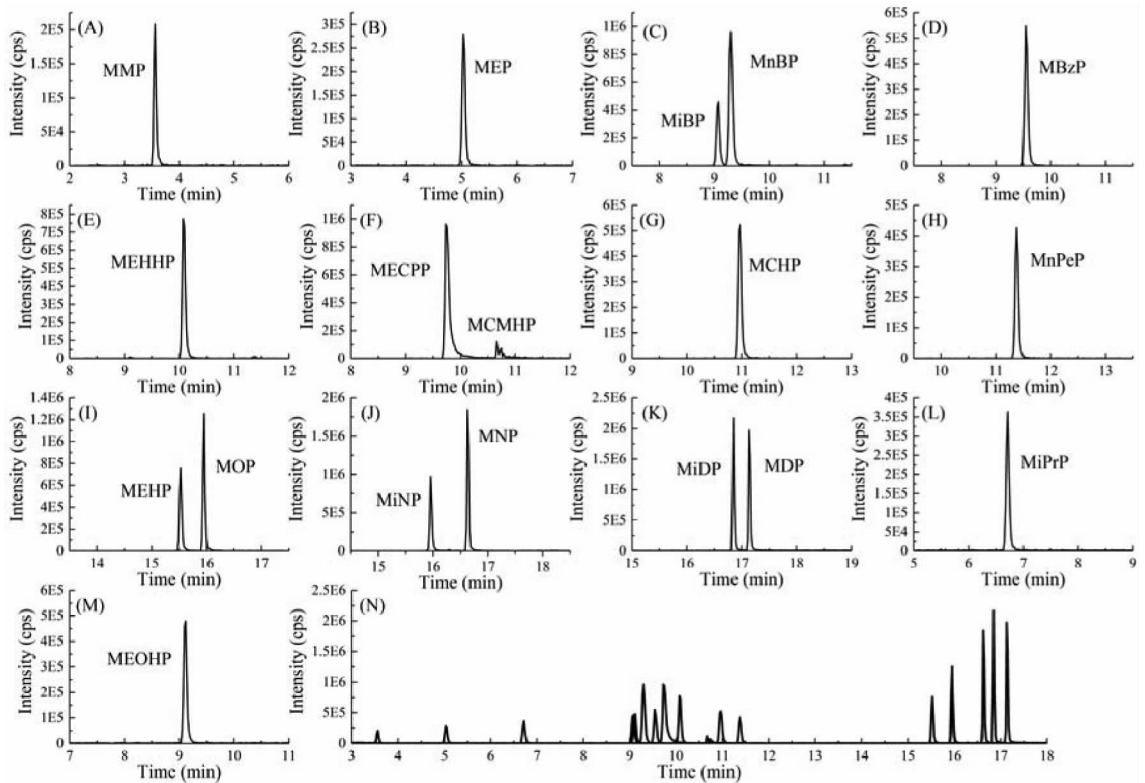
注:a 为定量离子。

2.2 色谱条件优化 分别比较了 Acquity UPLC BEH C18、Acquity UPLC HSS T3 以及 Acquity UPLC CSH C18 三种常用色谱柱对 18 种 PAEs 代谢物的分离效果。相同流动相条件下,BEH C18 柱对各组分的色谱分离表现最优,其次为 HSS T3,CSH C18 较差。各组分在 BEH C18 和 HSS T3 上的质谱响应差异不大,但对于 MnBP 和 MiBP 等同分异构体的分离,BEH C18 柱的表现明显优于 HSS T3,因此选用 BEH C18 作为分离柱。

比较了乙腈和甲醇两种有机相,水、0.05% 甲酸水溶液、0.05% 乙酸水溶液、5 mmol/L 乙酸铵作为水相条件下,18 种 PAEs 代谢物的色谱分离效果。结果表明,18 种 PAEs 代谢物在甲醇和乙腈下的质谱响应差异不大,各组分在甲醇下的保留时间稍长于乙腈下的保留时间,但对于 MnBP 和 MiBP 等同分异构体的分离,甲醇的表现要明显优于乙腈。当水相为水时,目标组分的色谱峰拖尾严重,加入酸或者铵盐,峰型

得到明显改善,各组分在 0.05% 乙酸水溶液的质谱响应和色谱峰型最优,其次为 0.05% 甲酸水溶液和 5 mmol/L 乙酸铵。还考察了 0.025% 乙酸水溶液、0.05% 乙酸水溶液和 0.1% 乙酸水溶液三种浓度的水溶液对各组分色谱分离的影响,结果显示,0.05% 乙酸水溶液对各组分的质谱响应和同分异构体的分离效果最优,其次为 0.025% 乙酸水溶液和 0.1% 乙酸水溶液。在优化的色谱条件下,加标浓度 10.0 ng/ml 的 18 种 PAEs 代谢物的 UPLC-MS/MS 色谱图见图 1。

2.3 前处理优化 对于 SLE,主要通过改变洗脱溶剂的种类和样液 pH 值来优化提取条件。选取环己烷、三氯甲烷、二氯甲烷、乙酸乙酯作为洗脱溶剂,考察其对 18 种 PAEs 代谢物的洗脱效果,采用目标组分的回收率进行评价,洗脱溶剂的用量均参照 SLE 小柱的推荐值 5 ml 进行操作。如图 2 所示,对于加标浓度为 10 ng/ml 的尿样,18 种 PAEs 代谢物在环己烷、三



注:图(A) - (M)为MRM谱图,(N)为总离子流图。

图1 加标浓度 10.0 ng/ml 的 18 种 PAEs 代谢物色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 18 PAEs metabolites spiked at a concentration of 10.0 ng/ml

氯甲烷、二氯甲烷、乙酸乙酯作为洗脱剂的回收率分别为 38.8% ~ 110.4%、58.2% ~ 117.2%、74.4% ~ 107.5% 和 82.4% ~ 110.8%。因此选用乙酸乙酯作为洗脱溶剂。此外,试验还对乙酸乙酯的用量进行了优化,比较了 3 ml、5 ml、8 ml 不同体积洗脱的效果。当使用 3 ml 乙酸乙酯洗脱时,部分组分的回收率低于 70%,洗脱不完全;而当采用 5 ml 和 8 ml 乙酸乙酯进行洗脱时,18 种 PAEs 代谢物的回收率相当,均在 80% 以上。因此最终采用 5 ml 乙酸乙酯进行洗脱。

为获得最佳回收率,本试验对 pH 为 4.5、6.5 及 9.0 的乙酸铵缓冲液进行了测试。图 3 为不同 pH 的缓冲溶液下,18 种 PAEs 代谢物的回收率结果。显然,当采用 pH4.5 的乙酸铵缓冲液时,所有目标组分经乙酸乙酯洗脱后,均获得了满意的回收率;当采用 pH6.5 的乙酸铵缓冲液时,MMP、MEP、MiPrP、MECPP 和 MCMHP 的回收率低于 50%;而当 pH 为 9.0 时,多达 10 种 PAEs 代谢物的回收率低于 50%。因此样品处理时采用 pH 为 4.5 的乙酸铵缓冲液。

根据文献报道<sup>[14-15]</sup>,2.0 ml 尿液在 20 μl β-葡萄糖醛酸酶(大于 85 000 U/ml)下酶解 2 h,即可实现完全酶解。本实验的尿液样品量为 0.50 ml,使用的 β-葡萄糖醛酸酶浓度大于 100 000 U/ml,因此选用

酶解液用量 20 μl、时间 2 h 作为酶解条件。通过对比实际尿样在 20 μl 酶解液 2 h 和 30 μl 酶解液 12 h 两种条件下的测定浓度,结果显示两者无显著差异。

2.4 复溶溶剂优化 样品净化液氮吹至近干后,比较了甲醇-水(1:9,v/v)、甲醇-水(1:1,v/v)及纯甲

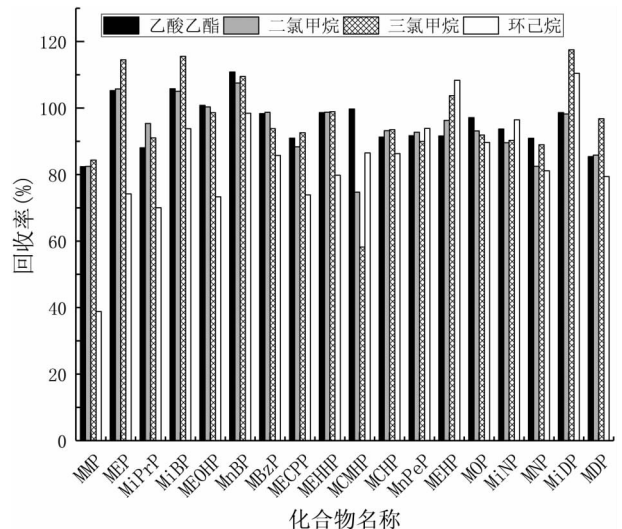


图2 不同溶剂洗脱下 18 种 PAEs 代谢物的回收率

Fig. 2 The recoveries of 18 PAEs metabolites with different elution solvent

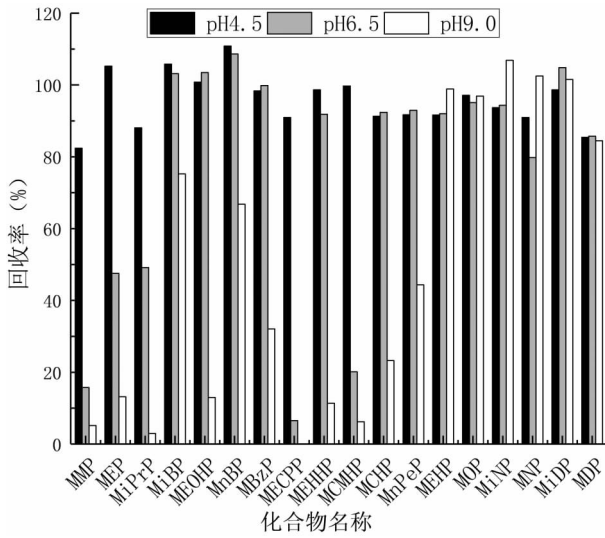


图 3 不同 pH 下 18 种 PAEs 代谢物的回收率

Fig. 3 The recoveries of 18 PAEs metabolites at different pH values

醇三种溶剂对 18 种 PAEs 代谢物的复溶效果。结果表明,以甲醇-水(1:9, v/v)为溶剂时,目标组分的信号强度明显低于用其他两种溶剂时的信号,而甲醇-水(1:1, v/v)和纯甲醇为溶剂时的信号强度相当;目标组分在纯甲醇中拖尾严重,而在其余两种溶剂中均可获得对称尖锐的峰型。因此复溶时选用甲醇-水(1:1, v/v)作为溶剂。

**2.5 样品基质效应** 取空白尿样按本法处理,对提

取后的空白基质加入 10 ng/ml 混合标准溶液,同时以甲醇-水(1:1, v/v)为溶剂配制同浓度的工作液,通过比较该两种工作液在质谱中的信号强度,计算基质效应,结果显示,除 MnBP 的基质效应为 1.40,表现为中等基质增强效应外,其余组分的基质效应在 0.99 ~ 1.13 之间,均表现为弱基质效应。基于此,本方法采用内标法进行定量,以降低基质效应的影响。

**2.6 方法的线性范围、检出限及定量限** 在最优分析参数下,测定标准系列溶液,以保留时间和离子丰度比定性,以目标组分与内标的定量离子峰面积比与其相应的质量浓度比作图,得到标准曲线。18 种 PAEs 代谢物在 0.10 ~ 80 ng/ml 之间呈现了良好的线性,相关系数均大于 0.999。取空白尿样进行提取净化,然后添加标准,以产生信噪比为 3 的响应时对应的浓度为检出限,信噪比为 10 对应的浓度为定量限,18 种 PAEs 代谢物的检出限为 0.001 ~ 0.07 ng/ml,定量限为 0.002 ~ 0.2 ng/ml。

**2.7 加标回收率与精密度** 在空白尿样中加入低、中、高(1.00, 10.0, 50.0 ng/ml)3 个浓度,按本法处理后,每个浓度水平分析 6 次。结果列于表 2,回收率在 84.0% ~ 113.0% 之间,相对标准偏差(RSD)在 1.1% ~ 9.5% 之间。通过对同一尿样进行日内精密度和日间精密度考察,结果日内精密度为 1.3% ~ 7.0%,日间精密度为 1.0% ~ 8.1%。结果表明,该方法回收率和稳定性较好,能满足生物样品检测的要求。

表 2 尿中 18 种 PAEs 代谢物的回收率和精密度(n=6)

Table 2 Recoveries and precision of 18 PAEs metabolites (n=6)

分析物	1.00 ng/ml 测定值 (ng/ml)	10.0 ng/ml 测定值 (ng/ml)	50.0 ng/ml 测定值 (ng/ml)	日内精密度 RSD (%)	日间精密度 RSD (%)
MMP	1.03 ± 0.05	10.4 ± 0.44	50.6 ± 1.68	6.1	3.6
MEP	1.02 ± 0.05	11.3 ± 0.37	50.8 ± 0.80	4.6	4.2
MiPrP	1.00 ± 0.06	11.0 ± 0.45	51.0 ± 1.07	2.2	4.3
MiBP	0.84 ± 0.04	10.4 ± 0.31	49.9 ± 1.57	3.7	2.7
MEOHP	0.97 ± 0.05	10.4 ± 0.34	50.1 ± 0.80	3.7	3.5
MnBP	1.03 ± 0.07	9.57 ± 0.79	49.6 ± 2.09	3.2	1.0
MBzP	1.00 ± 0.05	10.6 ± 0.19	50.6 ± 1.86	1.3	1.9
MECPP	1.03 ± 0.05	10.6 ± 0.38	50.9 ± 0.77	1.8	1.2
MEHHP	0.98 ± 0.03	10.3 ± 0.32	50.4 ± 0.80	2.9	3.3
MCMHP	0.89 ± 0.02	10.1 ± 0.69	52.4 ± 2.27	7.0	8.1
MCHP	1.03 ± 0.03	10.2 ± 0.53	50.2 ± 0.60	3.0	2.0
MnPeP	0.98 ± 0.04	10.0 ± 0.32	49.7 ± 1.49	3.3	3.0
MEHP	1.04 ± 0.10	10.4 ± 0.65	49.5 ± 2.01	4.3	4.2
MOP	1.00 ± 0.03	10.7 ± 0.11	50.0 ± 1.19	1.9	3.6
MiNP	0.96 ± 0.04	10.1 ± 0.18	48.5 ± 1.57	4.1	3.7
MNP	1.05 ± 0.02	10.7 ± 0.32	50.0 ± 1.18	2.1	2.9
MiDP	1.01 ± 0.03	10.2 ± 0.51	49.5 ± 1.58	2.9	3.9
MDP	0.98 ± 0.05	9.81 ± 0.31	49.0 ± 0.92	1.6	1.9

**2.8 样品测定** 采集 160 份人群尿液样品,按照本法进行测定,18 种 PAEs 代谢物的测定结果列于表 3。

结果显示,除 MiPrP、MnPeP、MiNP 未检出外,其余 15 种 PAEs 代谢物的检出率在 1.9% 至 100% 之间,其中

8 种 PAEs 代谢物的检出率为 100%。检出的组分按中位值从小到大排列依次为 MNP、MCHP、MDP、MOP、MBzP、MiDP、MCMHP、MEOHP、MEHP、MEHHP、

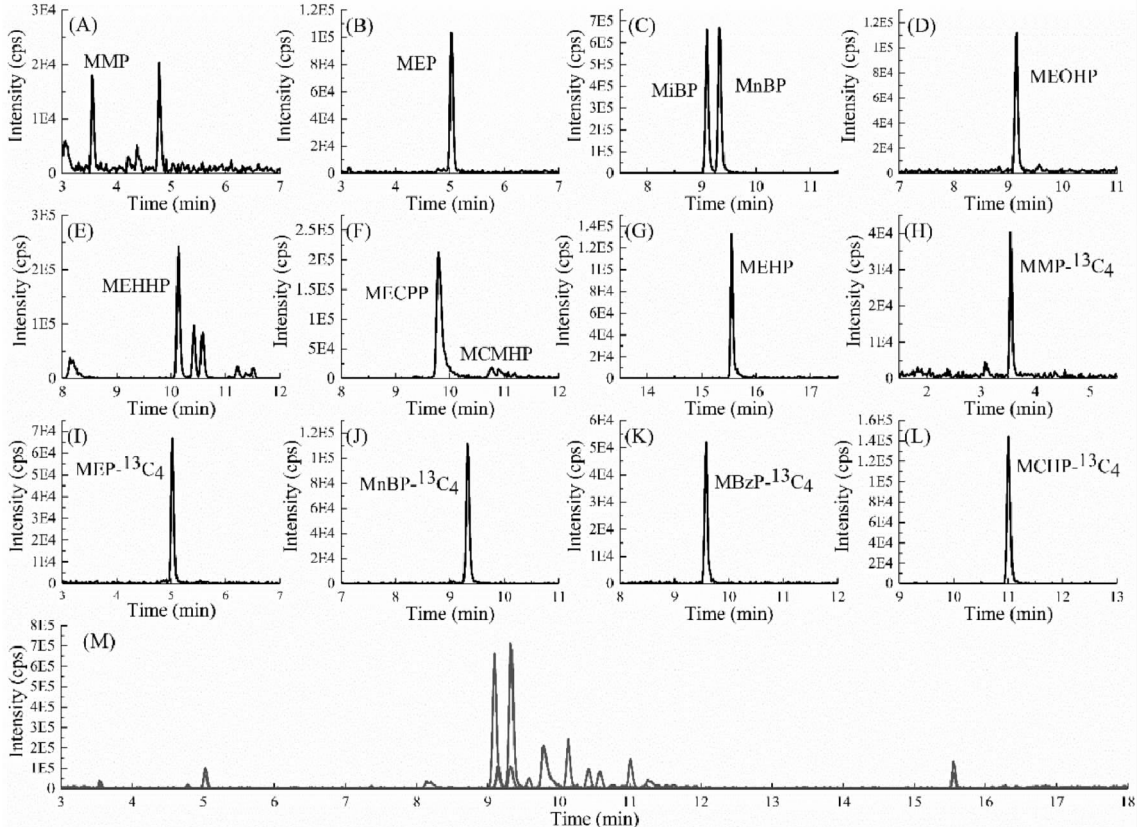
MMP、MECPP、MEP、MiBP、MnBP, 其中 MiBP 和 MnBP 的中位值分别为 116 ng/ml 和 126 ng/ml。图 4 为某一典型尿样的色谱图。

表 3 人尿中 18 种 PAEs 代谢物的测定结果

Table 3 Determination results of the 18 PAEs metabolites in human urines

分析物	阳性份数	阳性率(%)	最小值(ng/ml)	最大值(ng/ml)	平均值(ng/ml)	中位值(ng/ml)
MMP	158	98.8	1.44	88.20	13.80	10.20
MEP	160	100.0	0.94	290.00	35.60	15.50
MiPrP	0	0.0	/	/	/	/
MiBP	160	100.0	76.10	264.00	121.00	116.00
MEOHP	160	100.0	0.50	289.00	10.70	5.82
MnBP	160	100.0	25.90	645.00	148.00	126.00
MBzP	5	3.1	0.11	0.79	0.51	0.56
MECPP	160	100.0	0.72	481.00	19.20	11.70
MEHHP	160	100.0	0.78	529.00	18.40	10.10
MCMHP	160	100.0	0.35	120.00	7.42	4.74
MCHP	4	2.5	0.10	0.30	0.22	0.25
MnPeP	0	0.0	/	/	/	/
MEHP	160	100.0	3.65	90.50	9.86	8.05
MOP	3	1.9	0.26	0.38	0.31	0.29
MiNP	0	0.0	/	/	/	/
MNP	153	95.6	0.10	0.54	0.21	0.19
MiDP	20	12.5	0.37	5.30	2.18	2.02
MDP	4	2.5	0.11	0.44	0.27	0.26

注:/表示未检出。



注:图(A) - (L)为检出目标组分的MRM谱图,(M)为总离子流图。

图 4 典型尿样的色谱图

Fig. 4 Chromatograms of one typical urine sample

### 3 讨论

18 种 PAEs 代谢物中既有短链代谢物,又有长链代谢物,极性差异较大,加之多组分互为异构体,色谱分离是难点。选择合适的色谱柱是关键,本实验通过比较选择了通用性极佳的 BEH C18 色谱柱,该柱填料为杂化硅胶颗粒,耐受性较强,适用于分析非极性和中等极性化合物,18 种 PAEs 代谢物均能获得较好的色谱分离。PAEs 代谢物为羧基化合物,在中性或碱性条件下稳定性差,为防止其发生羧酸解离,色谱分离时可使用酸性流动相,促进其在色谱柱上的保留。实验结果也表明,水相中加入 0.05% 乙酸可以明显改善色谱峰型,增强质谱响应,但随着乙酸浓度的进一步增加,质谱响应呈减弱趋势,且同分异构体的分离也变差,可能是因为高浓度的酸会抑制目标物的离子化效率。

在 SLE 中,选择合适的吸附剂和洗脱条件对于提高回收率至关重要。目前,市场上 SLE 的吸附剂以硅藻土居多。根据 SLE 的工作原理,对于洗脱剂的选择,既要考虑是否与水混溶,又要考虑其对目标物的溶解性。本研究中,通过对 4 种不同溶剂的洗脱结果表明:使用环己烷洗脱时,MMP、MEP、MiPrP、MEOHP 及 MECPP 的回收率较低;三氯甲烷作为洗脱剂时,MCMHP 的回收率较低;而采用二氯甲烷和乙酸乙酯作为洗脱剂对所有化合物的回收均获得了满意结果,且乙酸乙酯的结果相对更优。环己烷和三氯甲烷的极性相对较小,而二氯甲烷和乙酸乙酯的极性比前两者要强,因此,用二氯甲烷和乙酸乙酯的回收率相对较高。此外,由于二氯甲烷对健康和环境的危害相对较大,洗脱时最终选用了乙酸乙酯。缓冲溶液的 pH 值对分析物的回收率起着关键作用。本实验通过比较不同 pH 值的回收率结果发现,除 6 个组分 MEHP、MOP、MiNP、MNP、MiDP 和 MDP 受 pH 的影响较小外,其余 12 种 PAEs 代谢物的回收率随着 pH 的升高而降低,在 pH 为 4.5 时回收率最优。由于 PAEs 代谢物呈弱酸性,当溶液 pH 呈弱酸性时,PAEs 代谢物以分子形式存在,萃取效率更高。

对于 PAEs 代谢物的检测,试验过程尽可能采用玻璃材质的器皿,避免使用可能引入干扰物的试剂和耗材。当样品前处理的空白值高时,可在净化前先采用甲醇多次淋洗 SLE 柱,以便降低本底干扰。

本文采用 SLE 结合 UPLC-MS/MS,建立了尿液中 18 种 PAEs 代谢物的分析方法。该方法操作简便,快速,方法准确性高,稳定性好,灵敏度高,适用于尿液样品中 PAEs 代谢物的定性定量分析,为人群生物监测快速测定人尿中 PAEs 代谢物提供了技术参考。

应用该方法对 160 份尿样进行了监测,结果显示当地人群 PAEs 暴露情况不容乐观。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

### 参考文献

- [1] 丁梦雨,康启越,张释义,等. 全国 23 个城市水源水中邻苯二甲酸酯类代谢物浓度调查[J]. 中国环境科学,2019,39(10):4205-4211.  
Ding MY, Kang QY, Zhang SY, et al. National survey of phthalate metabolites in drinking source water of 23 cities in China[J]. China Environmental Science, 2019, 39(10): 4205-4211. (In Chinese)
- [2] 袁方池,林云卓雅,邓欣,等. 农产品中邻苯二甲酸酯类(PAEs)的提取、检测和污染状况的研究进展[J]. 浙江农业科学,2022,63(11):2619-2626,2683.  
Yuan FC, Lin ZY, Deng X, et al. Research progress on extraction, detection and pollution status of phthalates (PAEs) in agricultural products [J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2022, 63(11): 2619-2626, 2683. (In Chinese)
- [3] 杨其帆,蔡菁婷,范惠莹. 环境空气细颗粒物中 16 种邻苯二甲酸酯类化合物的超高效液相色谱-串联质谱测定法[J]. 职业与健康,2023,39(23):3206-3211,3215.  
Yang QF, Cai JT, Fan HY. Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of 16 phthalate esters in fine particulate matter in ambient air [J]. Occupation and Health, 2023, 39(23): 3206-3211, 3215. (In Chinese)
- [4] 杜青平,陈洽,陈希超,等. 中国多环境介质中邻苯二甲酸酯类(PAEs)的浓度分布与健康风险评估[J/OL]. 环境科学,1-14 [2024-12-16]. <https://doi.org/10.13227/j.hjcx.202404121>.  
Du QP, Chen Q, Chen XC, et al. Concentration distribution and health risk assessment of phthalate esters (PAEs) in various environmental media in China[J/OL]. Environmental Science, 1-14 [2024-12-16]. <https://doi.org/10.13227/j.hjcx.202404121>. (In Chinese)
- [5] Hidalgo-Serrano M, Borrull F, Marcé RM, et al. Phthalate esters in Marine ecosystems: Analytical methods, occurrence and distribution[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2022, 151: 116598.
- [6] 雷春萍,郑代坤,牟伦武,等. 重庆市某农村地区 5~6 岁儿童尿液中邻苯二甲酸酯类代谢物调查[J]. 环境与健康杂志,2019,36(6):520-522.  
Lei CP, Zheng DK, Mu LW, et al. Urinary phthalate metabolites in children aged 5-6 years in some rural areas of Chongqing[J]. Journal of Environment and Health, 2019, 36(6): 520-522. (In Chinese)
- [7] Chen Y, Jiang L, Lu SY, et al. Organophosphate ester and phthalate ester metabolites in urine from primiparas in Shenzhen, China: Implications for health risks[J]. Environmental Pollution, 2019, 247: 944-952.
- [8] Martino-Andrade AJ, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54(1): 148-157.
- [9] Wang B, Qin XL, Xiao N, et al. Phthalate exposure and semen quality in infertile male population from Tianjin, China: Associations and potential mediation by reproductive hormones[J]. Science of the Total Environment, 2020, 744: 140673.

- [10] 刘莎,贺娟娟,常可为,等.孕早期邻苯二甲酸酯暴露对胎停育的影响研究[J].现代预防医学,2021,48(5):824-828,943.  
Liu S, He JJ, Chang KW, et al. Study on the effect of phthalates exposure in early pregnancy on missed abortion [J]. Modern Preventive Medicine, 2021, 48 (5): 824 - 828, 943. (In Chinese)
- [11] Kondo F, Ikai Y, Hayashi R, et al. Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography - mass spectrometry [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, 85(1): 92 - 96.
- [12] 王立媛,邹艳,吴平谷,等.固相萃取-气相色谱质谱联用法测定尿中邻苯二甲酸酯类代谢物[J].卫生研究,2017,46(6):991-995.  
Wang LY, Zou Y, Wu PG, et al. Determination of phthalate ester metabolites in urine by solid - phase extraction and gas chromatography - mass spectrometry [J]. Journal of hygiene research, 2017, 46(6): 991 - 995. (In Chinese)
- [13] 夏天,闵巍,詹铭.儿童尿液中5种邻苯二甲酸酯代谢物的固相萃取-超高液相色谱-串联质谱测定法[J].职业与健康,2020,36(7):890-893.  
Xia T, Min W, Zhan M. Determination of five phthalate metabolites in children urine by solid phase extraction - ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Occupation and Health, 2020, 36 (7): 890 - 893. (In Chinese)
- [14] 张续,韩林学,邱天,等.改进的UPLC-MS/MS法测定尿中12种邻苯二甲酸酯代谢物[J].环境卫生学杂志,2022,12(1):56-63.  
Zhang X, Han LX, Qiu T, et al. Determination of 12 metabolites of phthalates in human urine via modified UPLC - MS/MS [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2022, 12(1): 56 - 63. (In Chinese)
- [15] 石飞云,徐梦媛,靳艺,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定尿液中12种邻苯二甲酸酯类代谢物的含量[J].理化检验:化学分册,2022,58(6):708-714.  
Shi FY, Xu MY, Jin Y, et al. Determination of 12 metabolites of phthalates in urine by high performance liquid Chromatography - Tandem mass spectrometry [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2022, 58 (6): 708 - 714. (In Chinese)
- [16] Alvesrocha B, Gallimberti M, Paulo bianchi ximenez J, et al. An eco - friendly sample preparation procedure based on air - assisted liquid - liquid microextraction for the rapid determination of phthalate metabolites in urine samples by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2024, 266 ( Pt 1 ): 124974.
- [17] Chen R, Ning Z, Zheng C, et al. Simultaneous determination of 16 alkaloids in blood by ultrahigh - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry coupled with supported liquid extraction [J]. Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2019, 1128: 121789.
- [18] 商婷,赵灵娟,李佩,等.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[J].分析化学,2019,47(6):876-882.  
Shang T, Zhao LJ, Li P, et al. Determination of 10 kinds of monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by supported liquid extraction followed by liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(6): 876 - 882. (In Chinese)
- [19] 吴永富,米兰,邹多生,等.固相支撑液液萃取-液相色谱-串联质谱检测全血、尿液中氟胺酮和去甲氟胺酮[J].刑事技术,2022,47(5):517-522.  
Wu YF, Mi L, Zou DS, et al. SLE - HPLC - MS/MS determining f - ketamine and f - norketamine in blood or urine [J]. Forensic Science and Technology, 2022, 47(5): 517 - 522. (In Chinese)

收稿日期:2024-10-21

(上接第239页)

- [18] 中国肥胖问题工作组.中国成人超重和肥胖症预防与控制指南(节录)[J].营养学报,2004,(1):1-4.  
The China Working Group on Obesity. Guidelines for the prevention and control of overweight and obesity in Chinese adults (excerpt) [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2004, (1): 1 - 4. (In Chinese)
- [19] Ge LX, Hilal S, Müller - Riemenschneider F, et al. Association between Domain - Specific physical activity and cardiometabolic factors in a multiethnic Asian population: a longitudinal study [J]. Journal of Physical Activity & Health, 2023, 20(8): 702 - 715.
- [20] Opoku S, Gan Y, Fu WN, et al. Prevalence and risk factors for dyslipidemia among adults in rural and urban China: findings from the China National Stroke Screening and prevention project (CNSSPP) [J]. BMC Public Health, 2019, 19(1): 1500.
- [21] da Luz PL, Favarato D, Faria - Neto JR Jr, et al. High ratio of triglycerides to HDL - cholesterol predicts extensive coronary disease [J]. Clinics, 2008, 63(4): 427 - 432.
- [22] Kilpeläinen TO, Bentley AR, Noordam R, et al. Multi - ancestry study of blood lipid levels identifies four loci interacting with physical activity [J]. Nature Communications, 2019, 10 (1): 376.
- [23] Huang JH, Li RH, Huang SL, et al. Relationships between different types of physical activity and metabolic syndrome among Taiwanese workers [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 13735.
- [24] Poggio R, Melendi S, Gutierrez L, et al. Occupational physical activity and cardiovascular risk factors profile in the adult population of the southern cone of Latin America: results from the CESCAS I study [J]. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2018, 60(9): e470 - e475.
- [25] 陶然,黄建军,孙晨明,等.男性煤矿工人高体力活动水平与不同定义下血脂异常水平的关联性[J].中华疾病控制杂志,2017,21(2):123-127.  
Tao R, Huang JJ, Sun CM, et al. High physical activity is associated with an improved lipid profile among male coal miners [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2017, 21 (2): 123 - 127. (In Chinese)
- [26] Stanton KM, Kienzle V, Dinnes DLM, et al. Moderate - and High - Intensity exercise improves lipoprotein profile and cholesterol efflux capacity in healthy young men [J]. Journal of the American Heart Association, 2022, 11(12): e023386.

收稿日期:2024-10-18