

T/GAIA

广东省分析测试协会团体标准

T/ GAIA XXX—2024

尿液中多环芳烃代谢物的测定 液液萃取-超高效液相色谱串联质谱法

Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the urine samples
by liquid liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem
mass spectrometry

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2024/02/20)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

广东省分析测试协会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂与材料	1
6 仪器和设备	2
7 试样的制备与保存	2
8 分析步骤	2
9 结果计算和表述	3
10 结果计算和表述	4
11 方法的灵敏度、准确度和精密度	4
附录 A (资料性) 9 种羟基多环芳烃代谢物标准品信息	5
附录 B (资料性) 羟基多环芳烃标准溶液的特征离子质谱图	6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广东省分析测试协会提出。

本文件由广东省分析测试协会归口。

本文件起草单位：广州市疾病预防控制中心，广州市越秀区疾病预防控制中心，广州市番禺区疾病预防控制中心，沃特世科技（上海）有限公司，上海爱博才思分析仪器贸易有限公司。

本文件主要起草人：谭磊、周思、邓芬芳、刘虹、韩洁君、龙绍铭、曾玮、刘冰洁、马小锋、雷锦婷、彭荣飞、袁俊

尿液中多环芳烃代谢物的测定

液液萃取-超高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了尿液中9种羟基多环芳烃的液液萃取-超高效液相色谱串联质谱测定方法。

本标准适用于尿液中1-羟基萘、2-羟基萘、2-羟基茚、3-羟基茚、1-羟基菲、2-羟基菲、3-羟基菲、4-羟基菲、1-羟基芘9种羟基多环芳烃的检测，可用于尿液中羟基多环芳烃的检测及内暴露水平监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验用水规格和实验方法

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

尿液样品中的羟基多环芳烃酶解后，用正己烷萃取，超高效液相色谱串联质谱检测，内标法定量。

5 试剂与材料

5.1 试剂

5.1.1 水：GB/T 6682 所规定的一级水。

5.1.2 正己烷（ C_6H_{14} ）：质谱纯。

5.1.3 乙腈（ CH_3CN ）：质谱纯。

5.1.4 甲醇（ CH_3OH ）：质谱纯。

5.1.5 异丙醇（ C_3H_8O ）：色谱纯。

5.1.6 乙酸（ $C_2H_4O_2$ ）：分析纯。

5.1.7 乙酸钠（ $C_2H_3NaO_2$ ）：分析纯。

5.1.8 β -葡萄糖苷酸酶/芳基硫酸酯酶：大于 100000 units/mL

5.2 试剂配制

5.2.1 乙腈-水溶液（2+8）：取 20 mL 乙腈，加入 100 mL 超纯水，混匀。

5.2.2 乙酸-乙酸钠缓冲液（pH=5.0）：称取 34.4 g 乙酸钠，以适量纯水溶解，加入 4.4 mL 乙酸，用纯水定容至 1000 mL，用乙酸和氢氧化钠溶液调 pH 至 5.0。

5.2.3 异丙醇-甲醇溶液（1+9）：取 100 mL 异丙醇，加入 900 mL 甲醇，混匀。

5.3 标准品

5.3.1 羟基多环芳烃：1-羟基萘、2-羟基萘、2-羟基茚、3-羟基茚、1-羟基菲、2-羟基菲、3-羟基菲、4-羟基菲、1-羟基芘，纯度 $\geq 99.0\%$ ， $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存。具体内容见附录 A。

5.3.2 内标：1-羟基萘- D_8 、2-羟基萘- D_8 、3-羟基茚- D_9 、1-羟基菲- D_9 、2-羟基菲- D_9 、1-羟基芘- D_9 ，纯

度 $\geq 99.0\%$ ， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。具体内容见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液（ $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）：取适量的 1-羟基萘、2-羟基萘、2-羟基茚、3-羟基茚、1-羟基菲、2-羟基菲、3-羟基菲、4-羟基菲、1-羟基茈标准物质，精密称定，用乙腈配制成浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的单标标准储备液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 6 个月。

5.4.2 混合标准中间液（ $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）：吸取适量各标准储备液（5.4.1），用乙腈配制成浓度为 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 3 个月。

5.4.3 混合标准使用液（ $100\text{ }\mu\text{g/L}$ ）：吸取适量混合标准中间液（5.4.2），用乙腈配制成浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ 的混合标准使用液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 1 个月。

5.4.4 内标储备液（ $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）：取适量的 1-羟基萘- D_8 、2-羟基萘- D_8 、3-羟基茚- D_9 、1-羟基菲- D_9 、2-羟基菲- D_9 、1-羟基茈- D_9 内标标准物质，精密称定，用乙腈配制成浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的内标标准储备液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 6 个月。

5.4.5 混合内标中间液（ $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）：吸取适量内标标准储备液（5.4.4），用乙腈配制成浓度为 $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的混合内标标准中间液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 3 个月。

5.4.6 混合内标使用液（ $100\text{ }\mu\text{g/L}$ ）：吸取适量混合内标中间液（5.4.5），用乙腈配制成浓度为 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ 的混合内标标准使用液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 1 个月。

5.4.7 混合内标使用液（ $10\text{ }\mu\text{g/L}$ ）：吸取适量混合内标中间液（5.4.5），用乙腈配制成浓度为 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 的混合内标标准使用液， $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存，保存期 1 个月。

5.4.8 标准工作液：吸取适量的混合标准使用液（5.4.3）和混合内标使用液（5.4.6），用乙腈-水溶液（2+8）配成浓度为 $0.10\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $0.20\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $0.50\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $1.00\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $2.00\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $5.00\text{ }\mu\text{g/L}$ 、 $10.0\text{ }\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作液，内标浓度为 $2.0\text{ }\mu\text{g/L}$ ，当天配制。

6 仪器和设备

6.1 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 $0.000\text{ }01\text{g}$ 。

6.3 离心机： 5000 r/min 。

6.4 涡旋振荡器： 3000 r/min 。

6.5 氮吹浓缩仪。

6.6 恒温振荡器。

6.7 精密移液器。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试尿样，混合均匀。

a) 取混匀后的供试样品，作为供试试样；

b) 取混匀后的空白样品，作为空白试样。

在处理样本时，应严格遵从对潜在生物传染性样本处理的相关规定，使用时遵循生物安全规则，并根据规定对废物进行处理。

7.2 样本用量

一般用量为 $0.5\text{ mL}\sim 2.0\text{ mL}$ ，为保证取样的准确性和操作可行性，最小取样量不宜低于 0.5 mL 。

7.3 试料的保存

$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存，不可反复冻融。

8 分析步骤

8.1 提取

准确移取试样1.0 mL, 置于15 mL离心管中, 加入1.0 mL乙酸-乙酸钠缓冲液 (pH=5.0), 涡旋混匀, 加入 β -葡萄糖醛苷酸酶/芳基硫酸酯酶20 μ L, 涡旋混匀, 37 $^{\circ}$ C恒温水浴酶解16 h。冷却至室温, 加入浓度为10 μ g/L混合内标使用液40 μ L, 涡旋混匀。加入3 mL正己烷, 3000 r/min涡旋30 s, 2000 r/min振荡10 min, 3000 r/min振荡10 min, 5000 r/min离心10 min, 取上层有机层, 下层液体加入3 mL正己烷, 重复上述操作2次, 合并有机层, 室温氮吹至近干。加入200 μ L的乙腈-水溶液 (2+8), 涡旋30 s复溶, 供上机测定。

9 测定

9.1.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: CORTECS C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 4.6 mm, 2.7 μ m), 或相当者;
- 柱温: 27 $^{\circ}$ C;
- 进样量: 5 μ L;
- 流速: 0.3 mL/min;
- 流动相: A 为水, B 为异丙醇-甲醇溶液 (1+9), 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	65.0	35.0
2.00	65.0	35.0
15.0	50.0	50.0
25.0	0.0	100.0
29.0	0.0	100.0
30.0	65.0	35.0
38.0	65.0	35.0

9.1.2 质谱仪参考条件

- 离子源: 电喷雾离子源 (ESI);
- 扫描方式: 负离子扫描;
- 检测方式: 多反应离子监测 (MRM);
- 毛细管电压: 2.5 kv; 去溶剂化温度: 500 $^{\circ}$ C;
- 雾化气、气帘气、辅助加热气由氮气发生器产生或使用高纯氮气、碰撞气均为高纯氩气; 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度;
- 定性离子对、定量离子对, 锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 羟基多环芳烃特征离子参考质谱条件

化合物	保留时间 (min)	离子对	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
1-羟基萘	7.37	143.10>115.13*	48	30
		143.10>143.15	48	18
2-羟基萘	6.20	143.10>115.13*	25	26
		143.10>143.46	25	14
2-羟基茚	15.30	181.10>152.87*	25	28
		181.10>180.29	25	20
3-羟基茚	14.94	181.10>152.93*	40	18
		181.10>180.02	40	20
1-羟基菲	18.76	193.10>165.13*	25	34
		193.10>193.15	25	42
2-羟基菲	17.41	193.10>165.13*	25	36
		193.10>193.21	25	32

3-羟基菲	17.71	193.10>165.12*	25	36
		193.10>192.72	25	36
4-羟基菲	19.75	193.10>165.13*	25	34
		193.10>193.15	25	42
1-羟基芘	22.67	217.10>189.09*	25	38
		217.10>217.05	25	44
1-羟基萘-D ₈	6.91	150.07>122.12	25	28
2-羟基萘-D ₈	5.84	150.07>122.17	25	28
3-羟基芴-D ₉	14.49	190.16>162.00	30	28
1-羟基菲-D ₉	18.26	202.16>174.21	30	36
2-羟基菲-D ₉	17.02	202.16>174.21	62	34
1-羟基芘-D ₉	22.32	226.16>198.23	38	44

带*为定量离子

9.1.3 标准曲线的制作

将系列标准工作液分别注入超高效液相色谱串联质谱仪中，测得相应的峰面积，以标准工作液的质量浓度为横坐标，以被测组分的峰面积和内标物的峰面积之比为纵坐标，绘制标准曲线。标准溶液的质谱图参见附录B。

9.1.4 试样溶液的测定

将试样待测液注入超高效液相色谱串联质谱仪中，以保留时间定性，测得相应的峰面积，根据标准曲线得到试样待测液中羟基多环芳烃的质量浓度。如果试样待测液中被测物质的响应值超出仪器检测的线性范围，可适当稀释后测定。

9.2 空白试验

除不加试样外，采用相同的测定步骤进行操作。

10 结果计算和表述

试样中羟基多环芳烃的含量 X_i 按式 (1) 计算。

$$X_i = \frac{C_i \times V}{V_i} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X_i —试样中羟基多环芳烃 i 的含量，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/L}$)；

C_i —标准工作溶液测得相应被测组分溶液浓度，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/L}$)；

V —试样溶液定容体积，单位为微升 (μL)；

V_i —试样溶液取样体积，单位为微升 (μL)；

注：计算结果需扣除空白值。测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

11 方法的灵敏度、准确度和精密度

11.1 灵敏度

本方法1-羟基萘、2-羟基萘、2-羟基芴、3-羟基芴、1-羟基菲、2-羟基菲、3-羟基菲、4-羟基菲、1-羟基芘检出限为0.002 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为0.005 $\mu\text{g/L}$ 。

11.2 准确度

本方法中羟基多环芳烃在0.1 $\mu\text{g/L}$ ~10.0 $\mu\text{g/L}$ 的添加浓度水平时，回收率为60%~120%。

11.3 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

附录 A

(资料性)

化合物中英文名称、化学分子式和 CAS 号

化合物中英文名称、化学分子式和CAS号见表A.1。

表A.1 9种羟基多环芳烃及内标中英文名称、化学分子式和CAS号

序号	名称	英文名称	分子式	CAS号
1	1-羟基萘	1-hydroxynaphthalene	C ₁₀ H ₈ O	90-15-3
2	2-羟基萘	2-hydroxynaphthalene	C ₁₀ H ₈ O	135-19-3
3	2-羟基芴	2-hydroxyfluorene	C ₁₃ H ₁₀ O	2443-58-5
4	3-羟基芴	3-hydroxyfluorene	C ₁₃ H ₁₀ O	6344-67-8
5	1-羟基菲	1-hydroxyphenanthrene	C ₁₄ H ₁₀ O	2433-56-9
6	2-羟基菲	2-hydroxyphenanthrene	C ₁₄ H ₁₀ O	605-55-0
7	3-羟基菲	3-hydroxyphenanthrene	C ₁₄ H ₁₀ O	605-87-8
8	4-羟基菲	4-hydroxyphenanthrene	C ₁₄ H ₁₀ O	7651-86-7
9	1-羟基芘	1-hydroxypyrene	C ₁₆ H ₁₀ O	5315-79-7
10	1-羟基萘-D ₈	1-hydroxynaphthalene-D ₈	C ₁₀ D ₈ O	207569-03-7
11	2-羟基萘-D ₈	2-hydroxynaphthalene-D ₈	C ₁₀ D ₈ O	78832-61-8
12	3-羟基芴-D ₉	3-hydroxyfluorene-D ₉	C ₁₃ HD ₉ O	NA
13	1-羟基菲-D ₉	1-hydroxyphenanthrene-D ₉	C ₁₄ HD ₉ O	922510-23-4
14	2-羟基菲-D ₉	2-hydroxyphenanthrene-D ₉	C ₁₄ HD ₉ O	922510-19-8
15	1-羟基芘-D ₉	1-hydroxypyrene-D ₉	C ₁₆ HD ₉ O	132603-37-3

附录 B
(资料性)
特征离子质量色谱图

羟基多环芳烃标准溶液特征离子质量色谱图见 B.1。

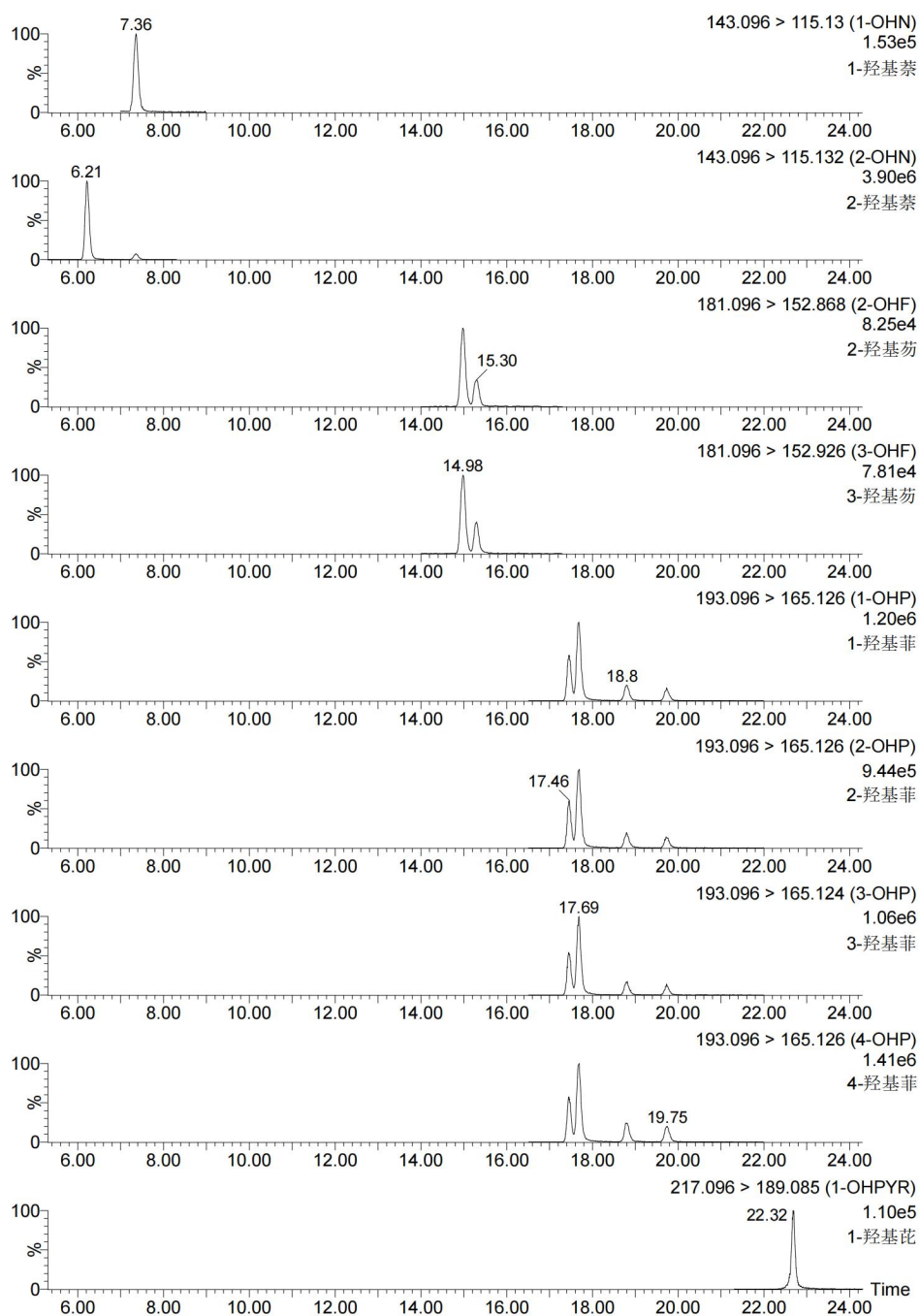


图 B.1 羟基多环芳烃标准溶液特征离子质量色谱图 (1.0 $\mu\text{g/L}$)