

广东省分析测试协会团体标准
《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》
编制说明

《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》编制组

2024年2月

目录

目录.....	2
1 项目背景.....	1
1.1 本标准制定的目的与意义.....	1
1.2 本标准与国内外标准关系的说明.....	2
2 标准起草工作简况.....	2
2.1 任务来源.....	2
2.2 起草单位、起草人.....	2
2.3 主要工作过程.....	3
3 标准编制原则和确定标准主要内容的论据.....	4
3.1 标准的编制原则.....	4
3.2 确定标准主要内容的论据.....	4
4 方法研究报告.....	5
4.1 方法研究目标.....	5
4.2 方法原理.....	5
4.3 试剂和材料.....	5
4.4 仪器和设备.....	6
4.5 样品.....	7
4.5.1 试样的制备.....	7
4.5.2 样本用量.....	7
4.5.3 试料的保存.....	7
4.6 分析步骤.....	7
4.6.1 提取.....	7
4.6.2 液相色谱参考条件.....	7
4.6.3 质谱仪参考条件.....	8
4.6.4 标准曲线的制作.....	9
4.6.5 试样溶液的测定.....	11
4.6.6 空白试验.....	11

4.7 结果计算和表述	11
4.8 方法的灵敏度、准确度和精密度	12
4.8.1 灵敏度	12
4.8.2 准确度和精密度	12
5 方法验证	13
5.1 方法验证方案	13
5.1.1 方法验证单位	13
5.1.2 测试要求	13
5.1.3 试样的制备及分析	14
5.2 方法验证过程	14
5.3 方法验证结果	14
5.3.1 线性范围和相关系数	14
5.3.2 检出限和定量限	16
5.3.3 准确度和精密度	17
5.3.4 实际样品测定结果	19
6 与现行法律、法规、政策及相关标准协调性	20
7 重大意见分歧的处理依据和结果	20
8 预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议	20
8.1 预期的社会效益	20
8.2 贯彻实施标准的要求和措施建议	20
9 附件材料（方法验证报告）	20
10 其他应当说明的事项	21

1 项目背景

1.1 本标准制定的目的与意义

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是一类来源于石油、煤、木材等不完全燃烧或者热解产生的持久性有机污染物, 它具有“致癌、致畸、致突变”作用。有研究显示孕期的 PAHs 暴露与不良出生结局、儿童智力发育水平低下及行为问题等有关。环境中的 PAHs 可通过环境、饮食、职业等暴露并经过呼吸道、皮肤、消化道等途径进入人体, 引发各种疾病, 危害人体健康。受各种因素如个体差异、生活习惯、饮食等的影响, 外暴露监测数据往往不能准确评价人体的真实暴露水平, 内暴露监测更能反应真实的接触水平。多环芳烃在人体内经代谢生成羟基多环芳烃 (OH-PAHs), 并和葡萄糖醛酸以及硫酸盐形成共轭反应, 促进其通过尿液等排出体外。因此, 建立人体生物样本尿液中 OH-PAHs 检测方法, 通过测定尿中 OH-PAHs 的水平来了解人群 PAHs 暴露水平及变化规律, 对于人群健康风险评估具有实际意义, 可为 PAHs 污染防治提供基础数据以及为职业暴露人群健康风险评估提供参考。本方法 9 种羟基多环芳烃信息见表 1。

表1 9种羟基多环芳烃标中英文名称、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

目前, 尿液样品中 OH-PAHs 前处理方法主要为液液萃取和固液萃取。固相

萃取所需要溶剂量小，重现性好，但操作复杂，费时耗力。液液萃取效率高、操作方便、成本低，被广泛应用于人体生物样本前处理。OH-PAHs 常见的测定方法有高效液相色谱法、气相色谱串联质谱法和液相色谱串联质谱法。由于尿样中 OH-PAHs 含量很低，高效液相色谱法灵敏度较低，不适合痕量水平检测；气相色谱串联质谱法通常需要衍生化处理，前处理过程繁琐、分析时间长；液相色谱串联质谱法灵敏度高、分析速度快，是目前主流分析方法。建立尿液中多环芳烃代谢物的液液萃取-超高效液相色谱串联质谱法可为大规模监测人群体内 PAHs 的暴露种类、负荷水平及变化趋势，评估内暴露健康风险提供有力技术支撑。

1.2 本标准与国内外标准关系的说明

经查询 ISO、IEC、DIN、AFNOR、AENOR、GOSTR、ANSI 等多个国内外标准组织、机构，暂无尿液等生物样本中羟基多环芳烃检测的相关标准。

2 标准起草工作简况

2.1 任务来源

根据《广东省分析测试协会关于下达 2023 年第一批团体标准立项的公告》（粤测协字〔2023〕08 号），广东省分析测试协会下达了编制“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”的项目计划，计划编号为：GAIA/JH20230102，由广州市疾病预防控制中心承担该标准的制订工作，任务书起止时间为：2023 年 3 月至 2024 年 3 月。

2.2 起草单位、起草人

（1）起草单位和参与单位

本方法起草单位有：广州市疾病预防控制中心

本方法参与单位有：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。

(2) 起草人及主要工作

主要起草人有谭磊、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，起草人员负责方法制定工作的组织、协调，相关资料的查阅、收集，标准文本及编制说明的起草、撰写，组织召开多次研讨会，通过电子邮件、传真等方式，征集、整理和归纳相关的意见和建议。

表 2 主要工作成员所负责的工作情况

起草人	工作职责
谭磊	负责标准的编写，实验方案确定
周思	负责实验，开展回收率、精密度等方法学研究
邓芬芳	负责样品前处理条件、色谱条件的优化
刘虹、龙绍铭	标准编写材料的收集及组织协调
韩洁君、雷锦婷、马小锋	样品的采购和方法验证
彭荣飞、袁俊	负责标准的工作指导，标准规范化把关等
曾玮、刘冰洁	收集统计验证数据

2.3 主要工作过程

(1) 标准编制项目于 2023 年 3 月获得立项，2023 年 4 月开始征集遴选参编单位，2023 年 5 月成立标准起草工作组，确定了项目组各成员的工作任务与安排。项目小组进行资料收集、整理。在深入讨论基础上，确定了方法技术方案。

(2) 2023 年 6 月，采购标准物质、试剂、耗材和实验样品。

(3) 2023 年 7 月至 2023 年 11 月，开展方法学研究包括样品前处理条件、色谱条件等仪器条件优化。完成方法检出限、定量限、线性范围、回收率、精密度等技术指标试验。

(4) 2023 年 12 月至 2024 年 1 月开展方法实验室间协同验证试验，由广东省疾病预防控制中心，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 5 家单位对该方法进行验证。

(5) 2024年2月,根据验证结果和建议,对本标准方法进行完善,并完成《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》(征求意见稿)及编制说明。

(6) 2024年XX月,广泛征集高校、科研院所、企业单位等相关领域的专家意见,对专家意见进行汇总,根据专家意见对征求意见稿进行修改,完成《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》(送审稿)及编制说明,并于2024年XX月XX日向广东省分析测试协会提交送审申请。

3 标准编制原则和确定标准主要内容的论据

3.1 标准的编制原则

本标准主要按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分: 标准的结构和编写规则》、GB/T 8170 《数值修约规则与极限数值的表示和判定》进行编写。本标准的制定主要遵循以下原则:

- (1) 方法的检出限和测定范围满足环境污染物内暴露的监测要求;
- (2) 建立标准分析方法准确度高、精密度好,满足各项方法特性指标要求;
- (3) 建立的标准分析方法具有科学性、先进性和可操作性,易于推广使用;
- (4) 标准内容符合国家法律、法规的有关要求,未与已有标准冲突。

3.2 确定标准主要内容的论据

按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分: 标准的结构和编写规则》、GB/T 8170 《数值修约规则与极限数值的表示和判定》的有关要求,确定了本标准的主要内容应包括以下十个部分: 范围、规范性引用文件、原理、试剂与材料、仪器和设备、试样的制备与保存、分析步骤、结果计算和表示、方法灵敏度、准确度和精密度。

4 方法研究报告

4.1 方法研究目标

建立适用于尿液样品中 9 种羟基多环芳烃浓度检测的液液萃取-超高效液相色谱串联质谱法，确定方法的检出限、定量限、准确度、精密度等参数，并开展方法验证，确定方法的可行性和适用性。

4.2 方法原理

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。

4.3 试剂和材料

(1) 试剂和标准品

- a) 水：GB/T 6682 所规定的一级水。
- b) 正己烷 (C_6H_{14})：质谱纯。
- c) 乙腈 (CH_3CN)：质谱纯。
- d) 甲醇 (CH_3OH)：质谱纯。
- e) 异丙醇 (C_3H_8O)：色谱纯。
- f) 乙酸 ($C_2H_4O_2$)：分析纯。
- g) 乙酸钠 ($C_2H_3NaO_2$)：分析纯。
- h) 标准品：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，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。

(2) 标准溶液制备

标准储备液 ($100\text{ }\mu\text{g/mL}$)：取适量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， $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存，保存期6个月。

混合标准中间液（1.0 μg/mL）：吸取适量各标准储备液，用乙腈配制成浓度为1.0 μg/mL的混合标准中间液，-18 °C下避光保存，保存期3个月。

混合标准使用液（100 μg/L）：吸取适量混合标准中间液，用乙腈配制成浓度为100 μg/L的混合标准使用液，-18 °C下避光保存，保存期1个月。

内标储备液（100 μg/mL）：取适量的1-羟基萘-D₈、2-羟基萘-D₈、3-羟基萘-D₉、1-羟基菲-D₉、2-羟基菲-D₉、1-羟基芘-D₉内标标准物质，精密称定，用乙腈配制成浓度为100 μg/mL的内标单标标准储备溶液，-18 °C下保存，保存期6个月。

混合内标中间液（1.0 μg/mL）：吸取适量内标单标储备液，用乙腈配制成浓度为1.0 μg/mL的混合内标标准中间液，-18 °C下避光保存，保存期3个月。

混合内标使用液（100 μg/L）：吸取适量混合内标中间液，用乙腈配制成浓度为100 μg/L的混合内标标准使用液，-18 °C下避光保存，保存期1个月。

混合内标使用液（10 μg/L）：吸取适量混合内标中间液，用乙腈配制成浓度为10 μg/L的混合内标标准使用液，-18 °C下避光保存，保存期1个月。

标准工作液：吸取适量的混合标准使用液（100 μg/L）和混合内标使用液（100 μg/L），用乙腈-水溶液（2+8）配成浓度为0.10 μg/L、0.20 μg/L、0.50 μg/L、1.00 μg/L、2.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L的系列标准工作液，内标浓度为2.0 μg/L，当天配制。

4.4 仪器和设备

- a) 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪。
- b) 分析天平：感量0.01 g和0.000 01g。
- c) 离心机：5000 r/min。
- d) 涡旋振荡器：3000 r/min。
- e) 氮吹浓缩仪。
- f) 恒温振荡器。
- g) 精密移液器。

4.5 样品

4.5.1 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。

4.5.2 样本用量

一般用量为 0.5 mL~2.0 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 2.0 mL。

4.5.3 试料的保存

-70 °C 以下保存，不可反复冻融。

4.6 分析步骤

4.6.1 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 °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。

4.6.2 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：CORTECS C₁₈ 色谱柱（100 mm×4.6 mm，2.7 μ m），或相当者；
- b) 柱温：27 °C；
- c) 进样量：5 μ L（视仪器灵敏度）。
- d) 流速：0.3 mL/min；

e) 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3。

表3 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

4.6.3 质谱仪参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 扫描方式：负离子扫描；
- c) 检测方式：多反应离子监测（MRM）；
- d) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂化温度：500 °C；
- e) 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；
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度；
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表4。

表4 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-羟基茈	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-羟基茈-D ₉	22.32	226.16>198.23	38	44

带*为定量离子

4.6.4 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。标准溶液的特征离子质谱图见图1。

图1 9种羟基多环芳烃混合标准溶液的特征离子图

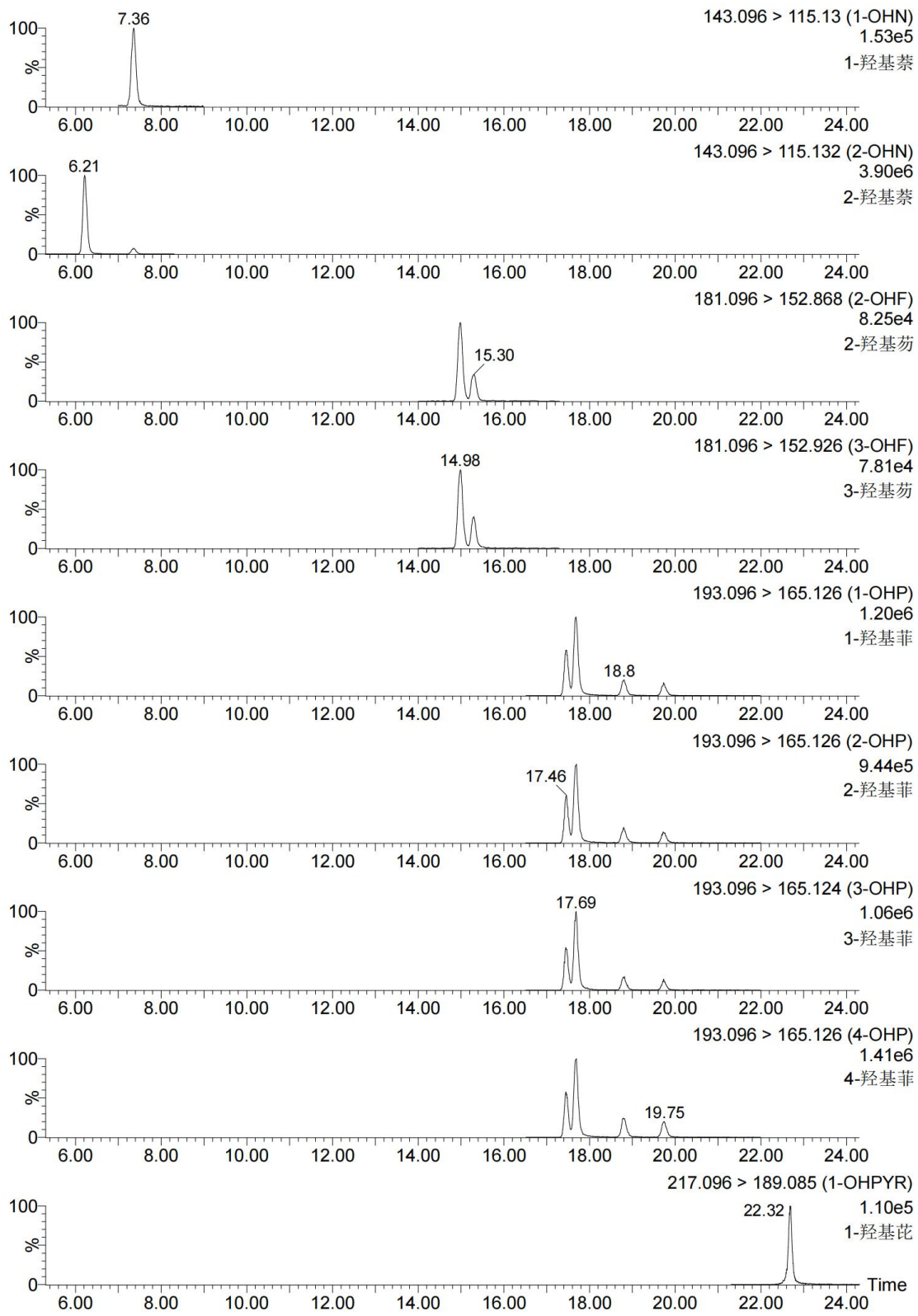


表 5 9 种羟基多环芳烃线性回归方程、保留时间及线性范围

化合物	保留时间 (min)	线性范围 (ng/mL)	回归方程	相关系数 (r)
1-羟基萘	6.21	0.1-10.0	y=31.511x+0.0257727	0.99995
2-羟基萘	7.36	0.1-10.0	y=3.88032x+0.0256616	0.99988
2-羟基芴	15.30	0.1-10.0	y=205.576x+6.30975	0.99958
3-羟基芴	14.98	0.1-10.0	y=3.03564x+0.0238417	0.99974
1-羟基菲	18.80	0.1-10.0	y=1.2123x-0.00132509	0.99995
2-羟基菲	17.46	0.1-10.0	y=0.858616x-0.00789248	0.99983
3-羟基菲	17.69	0.1-10.0	y=0.940209x-0.00407036	0.99999
4-羟基菲	19.75	0.1-10.0	y=1.22313x-0.00339531	0.99999
1-羟基茈	22.32	0.1-10.0	y=1.04442x-0.00974904	0.99971

4.6.5 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。

4.6.6 空白试验

除不加试样外，采用相同的测定步骤进行操作。

4.7 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。

4.8 方法的灵敏度、准确度和精密度

4.8.1 灵敏度

以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，结合样品前处理过程，计算得到方法检出限与定量限，结果见表 6。

表 6 羟基多环芳烃的方法检出限和定量限

化合物	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	0.002	0.005
2-羟基萘	0.002	0.005
2-羟基芴	0.002	0.005
3-羟基芴	0.002	0.005
1-羟基菲	0.002	0.005
2-羟基菲	0.002	0.005
3-羟基菲	0.002	0.005
4-羟基菲	0.002	0.005
1-羟基芘	0.002	0.005

本方法9种羟基多环芳烃检出限为0.002 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为0.005 $\mu\text{g/L}$ 。

4.8.2 准确度和精密度

向空白尿液样品中分别加入0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 三个浓度水平的羟基多环芳烃混合标准溶液进行加标回收实验，每个水平重复测定6次，计算得到平均回收率和相对标准偏差，结果见表8。

表8 加标回收和精密度实验测定结果 (n=6)

化合物	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
1-羟基萘	103.2	3.2	93.1	3.0	104.1	2.1
2-羟基萘	112.0	1.3	109.0	1.0	111.1	1.4
2-羟基芴	112.3	0.8	105.6	3.9	110.6	0.8
3-羟基芴	70.2	5.3	65.6	2.2	64.8	2.0
1-羟基菲	109.5	6.8	111.1	2.3	114.3	1.2
2-羟基菲	99.2	5.2	105.6	4.2	112.5	2.8
3-羟基菲	111.1	3.8	112.2	0.5	111.2	2.1
4-羟基菲	110.6	1.2	113.3	2.7	115.7	2.2
1-羟基茈	109.3	2.9	106.7	2.1	111.0	1.8

由表可以看出，不同浓度的空白加标样品，回收率在63.1%~118.3%，说明方法的准确度良好；相对标准偏差在0.5%~6.8%，说明方法的精密度良好。

5 方法验证

5.1 方法验证方案

5.1.1 方法验证单位

标准起草工作小组组织 5 个单位，包括广东省疾病预防控制中心，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，AB SCIEX 公司对本标准方法进行了验证。各验证单位都具有开展验证实验的实验室条件，所有成员都对本标准进行了方法验证及实际样品测试。

5.1.2 测试要求

(1) 标准曲线：由各单位根据实际实验条件及器皿规格自行配置标准曲线，要求相关系数 r 大于 0.99，且所有样品浓度落在线性范围内。

(2) 检出限和定量限：以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，结合样品前处理过程，计算得到方法检出限与定量限。

(3) 方法精密度：向空白尿液样品中分别加入低、中、高三个浓度水平的羟基多环芳烃混合标准溶液，每浓度制备 6 个平行样品，通过测定结果计算回收率和相对标准偏差（RSD）。

(4) 方法准确度：各验证实验室对三个样品分别做加标测定，加标浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ ，分别计算不同浓度样品的加标回收率。

(5) 实际样品测试：每个样品平行测试两次，得到两次测试结果平均值。

5.1.3 试样的制备及分析

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 μL ，涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴酶解 16 h。冷却至室温，加入浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 混合内标使用液 40 μL ，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 μL 的乙腈-水溶液（2+8），涡旋 30 s 复溶，供上机测定。

5.2 方法验证过程

筛选了有资历的验证单位，并提供方法草案、验证方案、标准溶液和验证报告格式。验证单位按照验证方案准备实验用品，在规定时间内完成验证实验并反馈验证结果报告。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

5.3 方法验证结果

5.3.1 线性范围和相关系数

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。结果见表 9。

表 9 羟基多环芳烃的线性范围和相关系数

化合物	实验室 1		实验室 2		实验室 3		实验室 4		实验室 5	
	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)
1-羟基萘	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9999	0.1-10.0	0.9993
2-羟基萘	0.1-10.0	0.9994	0.1-10.0	0.9992	0.1-10.0	0.9994	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9999
2-羟基芴	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9996	0.1-10.0	0.9994	0.1-10.0	0.9984
3-羟基芴	0.1-10.0	0.9999	0.1-10.0	0.9994	0.1-10.0	0.9978	0.1-10.0	0.9987	0.1-10.0	0.9980
1-羟基菲	0.1-10.0	0.9996	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9996	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9998
2-羟基菲	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9996	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9996	0.1-10.0	0.9993
3-羟基菲	0.1-10.0	0.9995	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9999	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9992
4-羟基菲	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9993	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9998	0.1-10.0	0.9995
1-羟基芘	0.1-10.0	0.9991	0.1-10.0	0.9997	0.1-10.0	0.9989	0.1-10.0	0.9993	0.1-10.0	0.9973

5.3.2 检出限和定量限

以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，结合样品前处理过程，计算得到方法检出限与定量限，结果见表 10。

表 10 羟基多环芳烃的检出限和定量限

化合物	实验室 1		实验室 2		实验室 3		实验室 4		实验室 5	
	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
2-羟基萘	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
2-羟基芴	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
3-羟基芴	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
1-羟基菲	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
2-羟基菲	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
3-羟基菲	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
4-羟基菲	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005
1-羟基芘	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005	0.002	0.005

5.3.3 准确度和精密度

在空白尿液样品中分别加入低、中、高三个浓度水平的羟基多环芳烃混合标准溶液，每浓度制备 6 个平行样品，计算回收率和相对标准偏差（RSD），以此评价方法的准确度和精密度，结果列于表 11。

表 11 尿液样品中羟基多环芳烃的平均加标回收率及相对标准偏差（n=6）

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	实验室 1		实验室 2		实验室 3		实验室 4		实验室 5	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
1-羟基萘	0.5	95.7	1.4	99.1	1.9	99.1	1.9	104.7	2.8	93.4	6.6
	1.0	77.4	7.3	97.5	2.5	97.5	2.5	101.2	2.4	105.8	3.8
	5.0	89.9	1.3	102.2	1.8	102.2	1.8	100.7	0.7	106.1	2.9
2-羟基萘	0.5	102.3	2.3	104.7	1.9	104.7	1.9	106.1	3.4	96.1	4.7
	1.0	100.2	2.1	106.3	1.2	106.3	1.2	101.4	2.8	104.9	2.2
	5.0	101.4	0.8	109.1	2.2	109.1	2.2	108.2	0.8	110.4	3.8
2-羟基茚	0.5	110.1	2.3	101.7	3.7	101.7	3.7	108.6	4.4	92.7	6.4
	1.0	85.0	5.8	103.3	2.1	103.3	2.1	109.8	3.9	100.0	4.0
	5.0	90.8	4.2	102.6	2.4	102.6	2.4	103.7	3.5	111.2	4.1
3-羟基茚	0.5	86.4	1.8	62.8	3.3	62.8	3.3	91.9	2.1	72.9	5.0

	1.0	73.1	1.3	63.2	3.0	63.2	3.0	95.6	4.9	86.5	3.5
	5.0	69.8	5.4	62.4	1.1	62.4	1.1	103.3	3.5	95.7	6.1
	0.5	105.8	2.3	94.6	1.7	94.6	1.7	99.5	4.4	90.4	6.5
1-羟基菲	1.0	104.7	2.4	105.8	1.8	105.8	1.8	99.1	3.4	101.2	4.5
	5.0	102.5	1.6	114.9	0.6	114.9	0.6	104.3	2.8	106.4	2.1
	0.5	86.9	5.4	78.7	4.7	78.7	4.7	109.1	1.9	94.6	5.4
2-羟基菲	1.0	87.5	3.1	88.1	2.6	88.1	2.6	106.0	4.8	104.7	4.4
	5.0	88.7	2.4	97.0	1.7	97.0	1.7	103.5	1.2	108.1	2.3
	0.5	107.6	3.4	86.3	4.2	86.3	4.2	105.3	2.4	91.8	4.2
3-羟基菲	1.0	105.2	3.4	97.9	4.6	97.9	4.6	102.7	2.1	102.8	4.9
	5.0	104.9	1.1	102.7	1.6	102.7	1.6	102.3	1.4	112.7	2.9
	0.5	102.2	2.0	91.0	6.8	91.0	6.8	86.2	4.7	73.1	7.5
4-羟基菲	1.0	98.6	1.6	102.4	4.5	102.4	4.5	84.9	1.6	78.0	6.0
	5.0	92.3	1.6	107.8	2.1	107.8	2.1	86.2	2.8	90.0	2.8
	0.5	95.1	3.4	103.0	2.7	103.0	2.7	89.0	4.5	73.0	5.4
1-羟基茈	1.0	110.7	1.7	105.4	2.1	105.4	2.1	97.9	3.3	82.7	7.6
	5.0	110.9	3.1	112.6	1.6	112.6	1.6	101.7	1.0	102.4	4.1

5.3.4 实际样品测定结果

表 13 尿液样品测定结果

化合物	实验室 1		实验室 2		实验室 3		实验室 4		实验室 5	
	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差 (%)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差 (%)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差 (%)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差 (%)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差 (%)
1-羟基萘	0.182	0.7	0.259	0.0	0.248	1.2	0.259	2.3	0.270	12.8
2-羟基萘	0.663	4.5	0.613	1.0	0.613	1.6	0.682	1.2	0.659	4.9
2-羟基芴	0.042	1.9	0.069	4.0	0.065	0.9	0.065	0.6	0.090	3.5
3-羟基芴	ND	—	ND	—	ND	—	0.025	1.6	0.033	9.0
1-羟基菲	0.046	12.6	0.069	9.2	0.053	1.1	0.068	8.5	0.060	3.6
2-羟基菲	0.023	7.7	0.046	9.5	0.025	4.8	0.031	7.8	0.054	11.6
3-羟基菲	0.022	8.9	0.046	5.6	0.025	4.9	0.026	1.5	0.069	8.2
4-羟基菲	0.004	11.1	0.017	0.0	0.007	0.0	ND	—	0.016	13.4
1-羟基芘	0.039	4.1	0.052	1.9	0.026	9.4	0.017	8.5	0.033	13.3

注：ND 为小于方法检出限。

6 与现行法律、法规、政策及相关标准协调性

本标准与现行相关法律、法规、政策及相关标准协调一致。符合现行相关法律、法规和政策及相关标准的规定。

7 重大意见分歧的处理依据和结果

本标准的编写过程中无重大分歧意见。

8 预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议

8.1 预期的社会效益

本标准实施可以为不同层次的实验室提供适宜的方法，为尿液中羟基多环芳烃的测定提供支持。本方法的实施可为大规模监测人群体内多环芳烃的暴露种类、负荷水平及变化趋势，评估其内暴露健康风险提供强有力技术支撑。方法的实施为多环芳烃的污染防治提供基础数据以及人群健康风险评估提供参考依据。本方法颁布具有重要的社会意义。

8.2 贯彻实施标准的要求和措施建议

本标准发布后，建议起草单位和广东省分析测试协会联合向相关检测机构开展标准的培训和宣贯。

9 附件材料（方法验证报告）

附件 1：方法验证报告-广东省疾病预防控制中心

附件 2：方法验证报告-广州市越秀区疾病预防控制中心

附件 3：方法验证报告-广州市番禺区疾病预防控制中心

附件 4：方法验证报告-沃特世科技（上海）有限公司

附件 5：方法验证报告-上海爱博才思分析仪器贸易有限公司

10 其他应当说明的事项

无

附件

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
方法验证报告

项目名称 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

委托单位 广州市疾病预防控制中心

委托时间 2024年01月08日

验证单位 广东省疾病预防控制中心

验证时间 2024年01月08日 2024年01月19日



一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《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》进行方法学验证。样品基质：尿液。

二. 样品前处理

准确移取 1.0 mL 尿液样本于 15 mL 离心管中，加入 1.0 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，涡旋混匀，加入 20 μL β -葡萄糖醛苷酸酶-硫酸酯酶，涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴酶解 16 h。恢复室温后，加入浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 内标 40 μL ，涡旋混匀。加入 3 mL 正己烷，3000 rpm 涡旋 30s，2000 rpm 振荡 10 min，3000 rpm 振荡 10 min，10000 rpm 离心 10 min，取上层有机层于氮吹管中，加入 3 mL 正己烷，重复萃取 2 次，合并有机层，氮吹至近干。加入 200 μL 的 20% 乙腈水，涡旋 30 s 复溶，待测定。

三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：Waters XEVO-TQS 超高效液相色谱串联质谱。

1.2 色谱柱：Waters CORTECS C18 色谱柱（100 mm \times 4.6 mm，2.7 μm ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：水-10%异丙醇甲醇溶液；

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	水 (%)	10%异丙醇甲醇 (%)
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

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：27 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：5 μL 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂化温度：500 $^{\circ}\text{C}$ 。

- c) 扫描方式：负离子扫描。
- d) 检测方式：多反应检测（MRM）。
- e) 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。
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 多环芳烃代谢物质谱参数

化合物	保留时间 (min)	离子对	锥孔电压 (V)	碰撞能 (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-羟基芴	15.30	181.10>152.87*	25	28
		181.10>180.29	25	20
3-羟基芴	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-D8	6.91	150.07>122.12	25	28
2-羟基萘-D8	5.84	150.07>122.17	25	28
3-羟基芴-D9	14.49	190.16>162.00	30	28
1-羟基菲-D9	18.26	202.16>174.21	30	36
2-羟基菲-D9	17.02	202.16>174.21	62	34
1-羟基芘-D9	22.32	226.16>198.23	38	44

2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性回归方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	$y = 46.9454x - 0.148316$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
2-羟基萘	$y = 6.01045x + 0.0687038$	0.1-10.0	0.9994	0.002	0.005

2-羟基芴	$y = 7.00077x - 0.0737217$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
3-羟基芴	$y = 1.40095x - 0.0347888$	0.1-10.0	0.9999	0.002	0.005
1-羟基菲	$y = 1.10834x - 0.0212147$	0.1-10.0	0.9996	0.002	0.005
2-羟基菲	$y = 0.864557x - 0.00120354$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
3-羟基菲	$y = 1.8698x + 0.00892143$	0.1-10.0	0.9995	0.002	0.005
4-羟基菲	$y = 1.35897x + 0.0128797$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005
1-羟基芘	$y = 0.861931x + 0.00959709$	0.1-10.0	0.9991	0.002	0.005

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 尿液样品中多环芳烃代谢物的加标回收率及相对标准偏差(n=7)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(n=7)							回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	7		
1-羟基萘	0.5	95.4	96.4	97.8	95.0	94.0	95.4	95.7	95.7	1.4
	1.0	90.2	79.5	79.0	77.9	74.2	74.8	79.3	77.4	7.3
	5.0	92.1	91.1	89.5	89.1	89.3	90.3	90.2	89.9	1.3
2-羟基萘	0.5	100.5	101.7	103.9	105.7	99.7	100.5	102.0	102.3	2.3
	1.0	98.9	101.6	96.9	101.0	102.6	99.5	100.0	100.2	2.1
	5.0	100.1	100.9	101.0	101.5	102.5	101.1	101.2	101.4	0.8
2-羟基芴	0.5	115.0	109.2	112.0	111.2	108.4	108.8	110.8	110.1	2.3
	1.0	84.3	84.6	90.2	91.1	80.2	79.1	84.9	85.0	5.8
	5.0	92.1	84.1	91.5	90.5	95.5	92.2	91.0	90.8	4.2
3-羟基芴	0.5	85.0	87.0	88.0	84.0	86.0	87.4	86.2	86.4	1.8
	1.0	72.5	74.8	72.5	72.2	73.6	72.7	73.1	73.1	1.3
	5.0	68.1	63.2	72.9	71.2	73.1	68.9	69.6	69.8	5.4
1-羟基菲	0.5	102.9	107.1	103.1	104.7	109.1	105.5	105.4	105.8	2.3
	1.0	102.2	102.3	102.0	106.8	105.2	107.6	104.3	104.7	2.4
	5.0	100.7	104.0	99.7	102.5	102.9	103.7	102.2	102.5	1.6
2-羟基菲	0.5	85.5	81.3	94.5	87.5	88.7	82.9	86.7	86.9	5.4
	1.0	90.9	91.7	84.7	85.9	87.3	87.7	88.0	87.5	3.1
	5.0	86.2	87.0	88.3	87.0	89.8	91.9	88.4	88.7	2.4
3-羟基菲	0.5	110.2	107.8	113.6	104.0	108.0	104.2	108.0	107.6	3.4
	1.0	102.6	108.4	100.4	106.4	102.0	109.0	104.8	105.2	3.4
	5.0	106.5	103.6	105.5	105.2	106.0	103.8	105.1	104.9	1.1
4-羟基菲	0.5	99.8	104.6	100.0	102.0	103.8	101.0	101.9	102.2	2.0
	1.0	96.2	98.7	98.2	99.1	100.4	96.7	98.2	98.6	1.6
	5.0	93.3	94.4	92.2	90.0	92.6	92.3	92.5	92.3	1.6
1-羟基芘	0.5	97.4	99.0	92.8	98.6	93.4	91.4	95.4	95.1	3.4
	1.0	110.0	110.1	114.3	109.2	109.6	110.6	110.6	110.7	1.7
	5.0	111.9	111.3	110.3	112.6	104.9	115.0	111.0	110.9	3.1

3. 样品测定结果

表 5 尿液样品测定结果

化合物	测定1 ($\mu\text{g/L}$)	测定2 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差%
1-羟基萘	0.182	0.181	0.182	0.7
2-羟基萘	0.678	0.648	0.663	4.5
2-羟基芴	0.042	0.041	0.042	1.9
3-羟基芴	ND	ND	ND	ND
1-羟基菲	0.043	0.049	0.046	12.6
2-羟基菲	0.022	0.024	0.023	7.7
3-羟基菲	0.023	0.021	0.022	8.9
4-羟基菲	0.003	0.004	0.004	11.1
1-羟基芘	0.040	0.038	0.039	4.1

四. 结论

实验对《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》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中多环芳烃代谢物的精密度在 0.8%~7.3%之间，回收率在 63.2%~115.0%之间，方法能满足尿液中多环芳烃代谢物的测定要求。

附件

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
方法验证报告

项目名称 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

委托单位 广州市疾病预防控制中心

委托时间 2023年12月25日

验证单位 越秀区疾病预防控制中心

验证时间 2023年12月25日 - 2023年12月29日



第十...

一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《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》进行方法学验证。样品基质：尿液。

二. 样品前处理

准确移取 1.0 mL 尿液样本于 15 mL 离心管中，加入 1.0 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，涡旋混匀，加入 20 μL β -葡萄糖醛苷酸酶-硫酸酯酶，涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴酶解 16 h。恢复室温后，加入浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 内标 40 μL ，涡旋混匀。加入 3 mL 正己烷，3000 rpm 涡旋 30s，2000 rpm 振荡 10 min，3000 rpm 振荡 10 min，4000 rpm 离心 10 min，取上层有机层于氮吹管中，加入 3 mL 正己烷，重复萃取 2 次，合并有机层，氮吹至近干。加入 200 μL 的 20% 乙腈水，涡旋 30 s 复溶，待测定。

三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：Waters XEVO-TQS 超高效液相色谱串联质谱。

1.2 色谱柱：Waters CORTECS C18 色谱柱（100 mm \times 4.6 mm，2.7 μm ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：水-10%异丙醇甲醇溶液；

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	水 (%)	10%异丙醇甲醇 (%)
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

c) 流速：0.3 mL/min ；

d) 柱温：27 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：5 μL 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂化温度：500 $^{\circ}\text{C}$ 。

- c) 扫描方式：负离子扫描。
- d) 检测方式：多反应检测（MRM）。
- e) 雾化气、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。
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 多环芳烃代谢物质谱参数

化合物	保留时间 (min)	离子对	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
1-羟基萘	7.62	143.10>115.13*	48	30
		143.10>143.15	48	18
2-羟基萘	6.42	143.10>115.13*	25	26
		143.10>143.46	25	14
2-羟基芴	11.98	181.10>152.87*	25	28
		181.10>180.29	25	20
3-羟基芴	15.30	181.10>152.93*	40	18
		181.10>180.02	40	20
1-羟基菲	19.10	193.10>165.13*	25	34
		193.10>193.15	25	42
2-羟基菲	17.60	193.10>165.13*	25	36
		193.10>193.21	25	32
3-羟基菲	17.69	193.10>165.12*	25	36
		193.10>192.72	25	36
4-羟基菲	20.04	193.10>165.13*	25	34
		193.10>193.15	25	42
1-羟基蒽	22.85	217.10>189.09*	25	38
		217.10>217.05	25	44
1-羟基萘-D8	7.19	150.07>122.12	25	28
2-羟基萘-D8	6.05	150.07>122.17	25	28
3-羟基芴-D9	14.76	190.16>162.00	30	28
1-羟基菲-D9	18.56	202.16>174.21	30	36
2-羟基菲-D9	17.26	202.16>174.21	62	34
1-羟基蒽-D9	22.57	226.16>198.23	38	44

2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性回归方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	$y = 47.0732x - 0.167551$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005
2-羟基萘	$y = 5.73207x + 0.128236$	0.1-10.0	0.9992	0.002	0.005

2-羟基芴	$y = 12.2088x + 0.0112578$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
3-羟基芴	$y = 0.350809x + 0.004637$	0.1-10.0	0.9994	0.002	0.005
1-羟基菲	$y = 1.00372x - 0.00391456$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005
2-羟基菲	$y = 0.912419x - 0.00653271$	0.1-10.0	0.9996	0.002	0.005
3-羟基菲	$y = 0.910562x - 0.00193281$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005
4-羟基菲	$y = 0.911502x - 0.0108189$	0.1-10.0	0.9993	0.002	0.005
1-羟基茈	$y = 1.13758x - 0.0333231$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 尿液样品中多环芳烃代谢物的加标回收率及相对标准偏差(n=7)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(n=7)							回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	7		
1-羟基萘	0.5	99.6	97.6	99.6	98.8	97.0	102.4	99.2	99.1	1.9
	1.0	102.3	98.5	98.6	98.2	95.6	95.9	98.2	97.5	2.5
	5.0	99.7	102.0	100.0	102.5	102.2	104.7	101.8	102.2	1.8
2-羟基萘	0.5	107.9	106.1	104.1	104.5	106.3	102.1	105.2	104.7	1.9
	1.0	104.8	107.3	107.7	105.7	106.7	104.5	106.1	106.3	1.2
	5.0	110.4	104.4	109.9	109.8	110.2	110.9	109.3	109.1	2.2
2-羟基芴	0.5	100.6	103.0	107.4	101.2	95.8	101.4	101.6	101.7	3.7
	1.0	105.8	105.8	101.6	104.7	103.1	100.7	103.6	103.3	2.1
	5.0	102.9	104.4	103.7	97.7	104.1	103.2	102.7	102.6	2.4
3-羟基芴	0.5	67.0	62.2	61.6	65.0	62.4	62.4	62.8	62.1	3.3
	1.0	64.4	61.5	61.7	61.9	66.0	64.5	63.3	63.2	3.0
	5.0	62.0	63.3	62.9	61.5	62.0	62.1	62.3	62.4	1.1
1-羟基菲	0.5	94.0	92.8	96.2	96.0	95.6	92.6	94.5	94.6	1.7
	1.0	105.7	108.7	105.7	105.2	106.6	102.7	105.8	105.8	1.8
	5.0	115.4	115.9	115.0	114.9	114.0	114.7	115.0	114.9	0.6
2-羟基菲	0.5	82.6	74.2	75.2	81.6	82.6	79.4	79.3	78.7	4.7
	1.0	92.7	88.3	89.5	88.7	87.0	86.1	88.7	88.1	2.6
	5.0	95.8	97.6	96.0	96.2	99.8	95.7	96.8	97.0	1.7
3-羟基菲	0.5	91.1	86.9	83.7	82.5	91.3	86.5	87.0	86.3	4.2
	1.0	90.4	101.2	96.1	93.1	101.1	99.2	96.8	97.9	4.6
	5.0	101.3	100.3	103.1	102.1	103.8	104.7	102.5	102.7	1.6
4-羟基菲	0.5	85.6	97.8	90.0	97.4	83.2	87.2	90.2	91.0	6.8
	1.0	97.4	102.8	98.2	97.7	107.4	106.8	101.7	102.4	4.5
	5.0	105.5	107.0	105.3	110.6	109.8	106.9	107.5	107.8	2.1
1-羟基茈	0.5	105.5	102.1	106.1	101.3	105.7	99.3	103.3	103.0	2.7
	1.0	103.7	105.5	108.2	107.3	102.3	104.4	105.2	105.4	2.1
	5.0	113.3	112.8	113.1	113.8	114.2	109.1	112.7	112.6	1.6

3. 样品测定结果

表 5 尿液样品测定结果

化合物	测定1 ($\mu\text{g/L}$)	测定2 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差%
1-羟基萘	0.259	0.259	0.259	0.0
2-羟基萘	0.610	0.616	0.613	1.0
2-羟基芴	0.068	0.071	0.069	4.0
3-羟基芴	ND	ND	ND	ND
1-羟基菲	0.066	0.073	0.069	9.2
2-羟基菲	0.044	0.049	0.046	9.5
3-羟基菲	0.045	0.048	0.046	5.6
4-羟基菲	0.017	0.017	0.017	0.0
1-羟基蒽	0.052	0.051	0.052	1.9

四. 结论

实验对《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》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中多环芳烃代谢物的精密度在 0.6%~6.8%之间，回收率在 61.5%~115.9%之间，方法能满足尿液中多环芳烃代谢物的测定要求。

2014.11.11

附件

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
方法验证报告

项目名称 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

委托单位 广州市疾病预防控制中心

委托时间 2023年12月18日

验证单位 番禺区疾病预防控制中心

验证时间 2023年12月18日-2023年12月23日



一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《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》进行方法学验证。样品基质：尿液。

二. 样品前处理

准确移取 1.0 mL 尿液样本于 15 mL 离心管中，加入 1.0 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，涡旋混匀，加入 20 μL β -葡萄糖醛苷酸酶-硫酸酯酶，涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴酶解 16 h。恢复室温后，加入浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 内标 40 μL ，涡旋混匀。加入 3 mL 正己烷，3000 rpm 涡旋 30s，2000 rpm 振荡 10 min，3000 rpm 振荡 10 min，4000 rpm 离心 10 min，取上层有机层于氮吹管中，加入 3 mL 正己烷，重复萃取 2 次，合并有机层，氮吹至近干。加入 200 μL 的 20% 乙腈水，涡旋 30 s 复溶，待测定。

三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：Waters XEVO-TQS 超高效液相色谱串联质谱。

1.2 色谱柱：Waters CORTECS C18 色谱柱（100 mm \times 4.6 mm，2.7 μm ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：水-10%异丙醇甲醇溶液；

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	水 (%)	10%异丙醇甲醇 (%)
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

c) 流速：0.3 mL/min ；

d) 柱温：27 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：5 μL 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂化温度：500 $^{\circ}\text{C}$ 。

- c) 扫描方式：负离子扫描。
- d) 检测方式：多反应检测（MRM）。
- e) 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、碰撞气均为高纯氦气；使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 多环芳烃代谢物质谱参数

化合物	保留时间 (min)	离子对	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
1-羟基萘	7.60	143.10>115.13*	48	30
		143.10>143.15	48	18
2-羟基萘	6.40	143.10>115.13*	25	26
		143.10>143.46	25	14
2-羟基芴	15.52	181.10>152.87*	25	28
		181.10>180.29	25	20
3-羟基芴	15.22	181.10>152.93*	40	18
		181.10>180.02	40	20
1-羟基菲	19.05	193.10>165.13*	25	34
		193.10>193.15	25	42
2-羟基菲	17.67	193.10>165.13*	25	36
		193.10>193.21	25	32
3-羟基菲	17.89	193.10>165.12*	25	36
		193.10>192.72	25	36
4-羟基菲	19.98	193.10>165.13*	25	34
		193.10>193.15	25	42
1-羟基芘	22.82	217.10>189.09*	25	38
		217.10>217.05	25	44
1-羟基萘-D8	7.14	150.07>122.12	25	28
2-羟基萘-D8	6.02	150.07>122.17	25	28
3-羟基芴-D9	14.73	190.16>162.00	30	28
1-羟基菲-D9	18.52	202.16>174.21	30	36
2-羟基菲-D9	17.22	202.16>174.21	62	34
1-羟基芘-D9	22.53	226.16>198.23	38	44



2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性回归方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	$y = 47.0732x + 0.25958$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
2-羟基萘	$y = 6.11116x + 0.127504$	0.1-10.0	0.9994	0.002	0.005

2-羟基芴	$y = 36.913x + 0.621623$	0.1-10.0	0.9996	0.002	0.005
3-羟基芴	$y = 0.461203x + 0.0646141$	0.1-10.0	0.9978	0.002	0.005
1-羟基菲	$y = 0.998306x + 0.0208605$	0.1-10.0	0.9996	0.002	0.005
2-羟基菲	$y = 0.847163x + 0.00602309$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
3-羟基菲	$y = 1.73684x + 0.0156433$	0.1-10.0	0.9999	0.002	0.005
4-羟基菲	$y = 0.826813x - 0.00666013$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
1-羟基茈	$y = 1.0673x - 0.0440632$	0.1-10.0	0.9989	0.002	0.005

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 尿液样品中多环芳烃代谢物的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(n=6)						回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
1-羟基萘	0.5	97.5	95.1	96.9	97.1	96.5	91.5	95.8	2.3
	1.0	96.6	93.4	93.3	92.5	92.1	94.7	93.8	1.7
	5.0	87.8	90.3	88.3	88.5	87.4	88.4	88.4	1.1
2-羟基萘	0.5	101.7	102.9	103.3	100.5	102.3	103.5	102.4	1.1
	1.0	101.9	102.5	101.4	102.5	101.5	102.0	101.9	0.5
	5.0	103.0	104.4	103.8	101.3	103.3	102.2	103.0	1.1
2-羟基芴	0.5	107.1	104.3	105.7	107.5	107.3	103.3	105.9	1.7
	1.0	103.7	106.4	101.7	103.6	104.2	99.7	103.2	2.2
	5.0	107.2	107.1	105.8	107.7	107.4	106.7	107.0	0.6
3-羟基芴	0.5	73.6	71.6	71.4	71.2	70.0	70.2	71.3	1.8
	1.0	74.5	74.1	72.9	76.9	78.2	74.2	75.1	2.7
	5.0	69.1	73.2	72.1	70.9	70.3	74.2	71.6	2.6
1-羟基菲	0.5	89.1	97.3	90.5	101.3	93.3	94.1	94.3	4.8
	1.0	91.2	93.0	90.9	90.7	88.1	95.7	91.6	2.8
	5.0	93.6	92.4	92.5	92.0	90.7	90.6	91.9	1.3
2-羟基菲	0.5	95.4	98.6	94.2	93.4	100.2	89.0	95.1	4.2
	1.0	92.4	96.3	99.0	103.5	104.3	98.0	98.9	4.5
	5.0	102.8	103.1	102.8	98.7	103.4	104.7	102.6	2.0
3-羟基菲	0.5	99.4	96.6	99.4	100.0	97.4	98.0	98.5	1.4
	1.0	102.6	107.2	104.6	109.5	111.9	109.8	107.6	3.2
	5.0	108.2	105.3	106.4	108.9	105.0	106.6	106.7	1.4
4-羟基菲	0.5	88.0	84.2	85.2	87.2	81.8	86.0	85.4	2.6
	1.0	84.5	83.8	80.5	82.8	84.6	83.2	83.2	1.8
	5.0	81.9	82.9	81.7	82.6	81.7	81.9	82.1	0.6
1-羟基茈	0.5	91.0	94.8	94.8	96.8	96.0	95.6	94.8	2.1
	1.0	97.9	102.8	97.5	97.4	97.7	90.5	97.3	4.0
	5.0	101.9	97.7	99.7	98.3	102.3	100.8	100.1	1.9

3. 样品测定结果

表 5 尿液样品测定结果

化合物	测定1 ($\mu\text{g/L}$)	测定2 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差%
1-羟基萘	0.249	0.246	0.248	1.2
2-羟基萘	0.618	0.608	0.613	1.6
2-羟基芴	0.064	0.065	0.065	0.9
3-羟基芴	ND	ND	ND	ND
1-羟基菲	0.052	0.053	0.053	1.1
2-羟基菲	0.026	0.025	0.025	4.8
3-羟基菲	0.025	0.024	0.025	4.9
4-羟基菲	0.007	0.007	0.007	0.0
1-羟基芘	0.024	0.027	0.026	9.4

四. 结论

实验对《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》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中多环芳烃代谢物的精密度在 0.5%~4.5%之间，回收率在 69.1%~111.9%之间，方法能满足尿液中多环芳烃代谢物的测定要求。



附件

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
方法验证报告

项目名称 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

委托单位 广州市疾病预防控制中心

委托时间 2023年12月14日

验证单位 沃特世科技(上海)有限公司

验证时间 2023年12月14日 2023年12月14日



一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《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》进行方法学验证。样品基质：尿液。

二. 样品前处理

准确移取 1.0 mL 尿液样本于 15 mL 离心管中，加入 1.0 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，涡旋混匀，加入 20 μ L β -葡萄糖醛苷酸酶-硫酸酯酶，涡旋混匀，37 $^{\circ}$ C 恒温水浴酶解 16 h。恢复室温后，加入浓度为 10 μ g/L 内标 40 μ L，涡旋混匀。加入 3 mL 正己烷，3000 rpm 涡旋 30s，2000 rpm 振荡 10 min，3000 rpm 振荡 10 min，4000 rpm 离心 10 min，取上层有机层于氮吹管中，加入 3 mL 正己烷，重复萃取 2 次，合并有机层，氮吹至近干。加入 200 μ L 的 20% 乙腈水，涡旋 30 s 复溶，待测定。

三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

1. 仪器条件

- 1.1 仪器及型号：Waters XEVO-TQS Micro 超高效液相色谱串联质谱。
- 1.2 色谱柱：Waters CORTECS C18 色谱柱（100 mm \times 4.6 mm，2.7 μ m）
- 1.3 色谱条件：
 - a) 流动相：水-10%异丙醇甲醇溶液；
 - b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	水 (%)	10%异丙醇甲醇 (%)
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

- c) 流速：0.3 mL/min ；
 - d) 柱温：27 $^{\circ}$ C；
 - e) 进样量：10 μ L。
- ### 1.4 质谱条件：
- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。
 - b) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂化温度：500 $^{\circ}$ C。

- c) 扫描方式：负离子扫描。
- d) 检测方式：多反应检测（MRM）。
- e) 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。
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 多环芳烃代谢物质谱参数

化合物	保留时间 (min)	离子对	锥孔电压 (V)	碰撞能 (eV)
1-羟基萘	6.59	143.10>115.13*	20	23
		143.10>143.00	20	3
2-羟基萘	5.75	143.10>115.13*	20	3
		143.10>143.00	20	3
2-羟基芴	11.98	181.10>152.87*	40	18
		181.10>180.02	40	20
3-羟基芴	11.67	181.10>152.93*	40	25
		181.10>180.02	40	20
1-羟基菲	15.82	193.10>165.00*	30	28
		193.10>193.00	30	3
2-羟基菲	14.36	193.10>165.00*	30	28
		193.10>193.00	30	3
3-羟基菲	14.60	193.10>165.12*	30	28
		193.10>193.00	30	3
4-羟基菲	16.64	193.10>165.00*	30	28
		193.10>193.00	30	3
1-羟基蒽	18.55	217.10>189.00*	30	28
		217.10>217.10	30	3
1-羟基萘-D8	6.29	150.07>122.12	20	20
2-羟基萘-D8	5.49	150.07>122.17	20	20
3-羟基芴-D9	11.23	190.16>162.51	40	18
1-羟基菲-D9	15.31	202.16>174.21	30	28
2-羟基菲-D9	13.85	202.16>174.21	30	28
1-羟基蒽-D9	18.33	226.16>198.10	30	32

2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性回归方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	$y = 2.77765x + 0.0049999$	0.1-10.0	0.9999	0.002	0.005
2-羟基萘	$y = 9.34847x + 0.131723$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005

2-羟基芴	$y = 5.8026x + 0.0331328$	0.1-10.0	0.9994	0.002	0.005
3-羟基芴	$y = 0.996353x - 0.0171491$	0.1-10.0	0.9987	0.002	0.005
1-羟基菲	$y = 1.16829x + 0.0261414$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005
2-羟基菲	$y = 1.46919x - 0.999600$	0.1-10.0	0.9996	0.002	0.005
3-羟基菲	$y = 3.49798x + 0.0565473$	0.1-10.0	0.9997	0.002	0.005
4-羟基菲	$y = 1.16723x + 0.0186831$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
1-羟基茈	$y = 1.5074x + 0.0280546$	0.1-10.0	0.9993	0.002	0.005

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 尿液样品中多环芳烃代谢物的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(n=6)						回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
1-羟基萘	0.5	101.6	103.8	103.8	102.2	108.4	108.2	104.7	2.8
	1.0	98.3	102.9	101.8	104.2	98.3	101.9	101.2	2.4
	5.0	101.5	99.6	100.9	101.6	100.2	100.6	100.7	0.7
2-羟基萘	0.5	101.8	110.0	109.0	102.4	108.6	104.6	106.1	3.4
	1.0	100.3	99.7	99.1	99.8	106.4	102.9	101.4	2.8
	5.0	109.4	108.1	108.0	107.6	109.1	107.1	108.2	0.8
2-羟基芴	0.5	112.6	106.2	100.6	113.4	110.4	108.4	108.6	4.4
	1.0	111.0	108.0	103.6	116.6	109.5	110.1	109.8	3.9
	5.0	98.7	101.6	104.7	108.7	106.5	102.1	103.7	3.5
3-羟基芴	0.5	92.0	95.4	92.4	89.6	91.2	90.8	91.9	2.1
	1.0	98.4	88.7	96.9	98.1	90.9	100.5	95.6	4.9
	5.0	100.3	97.6	107.1	105.7	104.4	104.6	103.3	3.5
1-羟基菲	0.5	96.0	93.8	97.8	101.6	101.8	105.8	99.5	4.4
	1.0	100.4	98.0	96.6	98.1	105.1	96.1	99.1	3.4
	5.0	102.9	103.7	108.2	106.5	104.7	99.8	104.3	2.8
2-羟基菲	0.5	111.8	110.4	106.0	109.6	109.2	107.4	109.1	1.9
	1.0	104.2	105.6	99.1	105.7	106.7	114.9	106.0	4.8
	5.0	103.6	104.8	101.7	103.6	104.8	102.6	103.5	1.2
3-羟基菲	0.5	107.2	102.2	103.6	108.8	106.4	103.6	105.3	2.4
	1.0	100.8	101.1	100.9	102.9	104.6	105.9	102.7	2.1
	5.0	103.3	102.7	99.7	102.1	103.8	102.0	102.3	1.4
4-羟基菲	0.5	89.8	88.8	89.8	81.8	86.0	80.8	86.2	4.7
	1.0	84.7	83.9	84.6	83.6	85.5	87.3	84.9	1.6
	5.0	87.1	83.8	84.1	86.9	90.2	84.8	86.2	2.8
1-羟基茈	0.5	85.2	86.6	93.0	84.8	90.2	94.0	89.0	4.5
	1.0	96.1	97.7	92.8	99.8	102.2	98.7	97.9	3.3
	5.0	103.1	102.1	100.5	101.0	102.2	101.4	101.7	1.0

3. 样品测定结果

表 5 尿液样品测定结果

化合物	测定1 ($\mu\text{g/L}$)	测定2 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差%
1-羟基萘	0.256	0.262	0.259	2.3
2-羟基萘	0.678	0.686	0.682	1.2
2-羟基芴	0.065	0.064	0.065	0.6
3-羟基芴	0.025	0.026	0.025	1.6
1-羟基菲	0.065	0.071	0.068	8.5
2-羟基菲	0.032	0.030	0.031	7.8
3-羟基菲	0.027	0.026	0.026	1.5
4-羟基菲	ND	ND	ND	ND
1-羟基芘	0.08	0.09	0.017	8.5

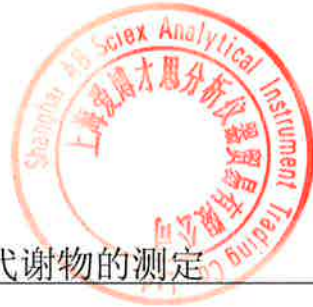
四. 结论

实验对《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》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中多环芳烃代谢物的精密度在 0.7%~4.9%之间，回收率在 84.9%~109.8%之间，方法能满足尿液中多环芳烃代谢物的测定要求。



附件

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
方法验证报告



项目名称 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

委托单位 广州市疾病预防控制中心

委托时间 2024年01月09日

验证单位 AB SCIEX 公司

验证时间 2024年01月09日 - 2024年01月19日

一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《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》进行方法学验证。样品基质：尿液。

二. 样品前处理

准确移取 1.0 mL 尿液样本于 15 mL 离心管中，加入 1.0 mL 乙酸-乙酸钠缓冲溶液，涡旋混匀，加入 20 μL β -葡萄糖醛苷酸酶-硫酸酯酶，涡旋混匀，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴酶解 16 h。恢复室温后，加入浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 内标 40 μL ，涡旋混匀。加入 3 mL 正己烷，3000 rpm 涡旋 30s，2000 rpm 振荡 10 min，3000 rpm 振荡 10 min，4000 rpm 离心 10 min，取上层有机层于氮吹管中，加入 3 mL 正己烷，重复萃取 2 次，合并有机层，氮吹至近干。加入 200 μL 的 20% 乙腈水，涡旋 30 s 复溶，待测定。

三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：AB Sciex QTrap 5500+ 质谱仪。

1.2 色谱柱：Waters CORTECS C18 色谱柱（100 mm \times 4.6 mm，2.7 μm ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：水-10%异丙醇甲醇溶液；

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	水 (%)	10%异丙醇甲醇 (%)
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

c) 流速：0.3 mL/min ；

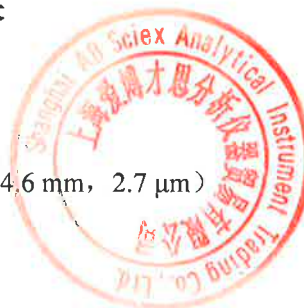
d) 柱温：27 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：5 μL 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 电喷雾离子源电压：-4500 v；离子源温度：550 $^{\circ}\text{C}$ 。



- c) 扫描方式：负离子扫描。
- d) 检测方式：多反应监测模式（MRM）。
- e) 雾化气、气帘气、辅助气由氮气发生器产生；使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- f) 去簇电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，去簇电压及碰撞电压见表 2。

表 2 多环芳烃代谢物质谱参数

化合物	保留时间 (min)	离子对	DP (V)	CE (V)
1-羟基萘	6.79	143.1>115.1*	-100	-33
		143.1>143.1	-100	-10
2-羟基萘	5.79	143.1>115.1*	-90	-35
		143.1>143.1	-90	-10
2-羟基芴	14.27	181.1>180.0*	-90	-33
		181.1>153.1	-90	-28
3-羟基芴	13.80	181.1>180.0*	-90	-26
		181.1>153.1	-90	-29
1-羟基菲	20.59	193.0>165.0*	-84	-41
		193.0>193.0	-84	-10
2-羟基菲	18.19	193.0>165.0*	-84	-41
		193.0>193.0	-84	-10
3-羟基菲	18.61	193.0>165.0*	-84	-41
		193.0>192.0	-84	-10
4-羟基菲	22.24	193.0>165.0*	-84	-41
		193.0>193.0	-84	-10
1-羟基茈	27.23	217.0>189.0*	-90	-46
		217.10>217.0	-90	-12
1-羟基萘-D8	6.43	150.07>122.12	-100	-33
2-羟基萘-D8	5.49	150.07>122.17	-100	-35
3-羟基芴-D9	13.12	190.1>162.00	-90	-29
1-羟基菲-D9	19.74	202.0>174.0	-84	-41
2-羟基菲-D9	17.41	202.0>174.0	-84	-41
1-羟基茈-D9	26.92	226.16>198.23	-90	-46

2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

化合物	线性回归方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (r)	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1-羟基萘	$y = 0.96789x - 0.00593$	0.1-10.0	0.9993	0.002	0.005
2-羟基萘	$y = 3.19590x + 0.00502$	0.1-10.0	0.9999	0.002	0.005

2-羟基芴	$y=3.28284x-0.01868$	0.1-10.0	0.9984	0.002	0.005
3-羟基芴	$y=0.96059x+0.00171$	0.1-10.0	0.9980	0.002	0.005
1-羟基菲	$y=0.59456x-0.00121$	0.1-10.0	0.9998	0.002	0.005
2-羟基菲	$y=0.81192x-0.00801$	0.1-10.0	0.9993	0.002	0.005
3-羟基菲	$y=6.97791x-0.05232$	0.1-10.0	0.9992	0.002	0.005
4-羟基菲	$y=0.49959x-0.00211$	0.1-10.0	0.9995	0.002	0.005
1-羟基茈	$y=0.80459x-0.02407$	0.1-10.0	0.9973	0.002	0.005

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 尿液样品中多环芳烃代谢物的加标回收率及相对标准偏差(n=7)

化合物	添加浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(n=7)							回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	7		
1-羟基萘	0.5	85.2	95.7	92.9	88.8	88.6	102.2	92.2	93.4	6.6
	1.0	99.5	102.4	108.8	107.5	102.3	108.8	104.9	105.8	3.8
	5.0	102.4	106.4	107.2	101.2	107.0	109.1	105.6	106.1	2.9
2-羟基萘	0.5	103.0	89.8	94.3	97.5	98.4	99.8	97.1	96.1	4.7
	1.0	108.9	102.2	107.5	105.1	104.9	104.6	105.5	104.9	2.2
	5.0	110.1	106.1	113.4	110.5	105.6	116.6	110.4	110.4	3.8
2-羟基芴	0.5	100.7	89.2	89.0	100.4	96.2	87.5	93.8	92.7	6.4
	1.0	103.9	96.0	100.2	99.6	106.5	97.3	100.6	100.0	4.0
	5.0	107.4	110.2	110.8	119.5	107.7	108.5	110.7	111.2	4.1
3-羟基芴	0.5	68.8	67.7	72.3	77.6	74.5	72.8	72.3	72.9	5.0
	1.0	82.2	88.0	83.4	89.8	87.8	84.2	85.9	86.5	3.5
	5.0	92.0	92.1	97.6	105.4	89.0	95.0	95.2	95.7	6.1
1-羟基菲	0.5	97.7	87.6	83.2	89.0	92.7	98.4	91.4	90.4	6.5
	1.0	103.6	108.7	101.4	102.4	96.9	96.3	101.6	101.2	4.5
	5.0	106.3	108.9	108.0	107.6	104.9	102.8	106.4	106.4	2.1
2-羟基菲	0.5	86.0	90.2	97.0	98.9	91.3	97.0	93.4	94.6	5.4
	1.0	110.9	98.6	107.3	102.4	109.8	104.8	105.6	104.7	4.4
	5.0	109.3	105.9	108.0	107.4	112.7	106.3	108.3	108.1	2.3
3-羟基菲	0.5	89.5	89.4	96.5	94.9	86.3	92.2	91.5	91.8	4.2
	1.0	106.1	101.1	108.0	103.7	106.2	94.2	103.3	102.8	4.9
	5.0	113.9	110.9	112.2	108.7	118.2	113.5	112.9	112.7	2.9
4-羟基菲	0.5	65.6	80.9	71.1	75.6	69.4	69.7	72.0	73.1	7.5
	1.0	83.4	70.9	80.8	78.0	83.1	76.3	78.7	78.0	6.0
	5.0	90.8	89.6	89.9	87.4	94.6	88.2	90.1	90.0	2.8
1-羟基茈	0.5	65.6	72.1	75.7	75.8	72.5	69.9	71.9	73.0	5.4
	1.0	91.5	74.9	82.4	91.2	80.8	82.9	83.9	82.7	7.6
	5.0	99.7	106.0	106.2	101.4	103.4	95.3	102.0	102.4	4.1

3. 样品测定结果

表 5 尿液样品测定结果

化合物	测定1 ($\mu\text{g/L}$)	测定2 ($\mu\text{g/L}$)	平均值 ($\mu\text{g/L}$)	相对偏差%
1-羟基萘	0.288	0.253	0.270	12.8
2-羟基萘	0.675	0.643	0.659	4.9
2-羟基芴	0.091	0.088	0.090	3.5
3-羟基芴	0.034	0.031	0.033	9.0
1-羟基菲	0.061	0.059	0.060	3.6
2-羟基菲	0.057	0.051	0.054	11.6
3-羟基菲	0.066	0.072	0.069	8.2
4-羟基菲	0.017	0.015	0.016	13.4
1-羟基芘	0.035	0.031	0.033	13.3

四. 结论

实验对《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》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中多环芳烃代谢物的精密度在 2.1% ~ 7.6%之间，回收率在 65.6% ~ 119.5%之间，方法能满足尿液中多环芳烃代谢物的测定要求。