

尿中多环芳烃羟基代谢物分析方法研究进展

秦晓蕾¹, 张利文^{1,2*}, 陈曦¹, 汤乃军¹, 赵力军¹

(1 天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070 2 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘要: 多环芳烃 (PAHs) 是广泛分布于环境及职业场所的致癌性化合物, PAHs的生物标志物可以准确反映人体对 PAHs的内暴露情况, PAHs在代谢物中主要以 OH-PAHs与葡萄糖醛酸结合物的形式存在, 本文对尿中 OH-PAHs的不同前处理过程与分析方法分别进行了比较与阐述。

关键词: 多环芳烃; 羟基代谢物

中图分类号: R135.99 X18 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2010)06-0429-05

Progress on analytical methods for hydroxyl metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine

QIN Xiaolei, ZHANG Liwen^{1,2*}, CHEN Xi, TANG Naijun, ZHAO Lijun

(1. College of Public Health in Tianjin Medical University Tianjin 300070 China 2. College of Environmental Sciences and Engineering in Peking University Beijing 100871, China)

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are carcinogenic compounds which are widespread in life environments and occupational areas, the biomarkers of PAHs can accurately reflect the internal exposure dosage to the PAHs which exist in the combined form of OH-PAHs with glucuronic acid. The different pretreatment and analysis methods of OH-PAHs in urine are described and compared respectively in this paper.

Key words: polycyclic aromatic hydrocarbons; OH-PAHs

多环芳烃 (PAHs) 是一类环境致癌性化合物, PAHs的来源可分为人为与天然两种, 前者是 PAHs污染的主要来源^[1]。自然环境中火山活动、森林火灾以及草原火灾将排放一定量的 PAHs, 人为 PAHs主要来自于石油、煤炭等矿物燃料及有机物的热解或不完全燃烧^[2]。工业锅炉、家用炉灶以及机动车等排放的废气, 炼油厂、煤焦油加工厂、铝制品厂等排放出的废气和废水中都含有大量的 PAHs^[3]。此外还存在于熏制食物和香烟烟雾中^[4]。人们在日常生活中通过呼吸、饮食和吸烟甚至皮肤接触均有可能不同程度地暴露 PAHs, 增加罹患肺癌、食管癌、胃癌、结肠癌、皮肤癌和膀胱癌等恶性肿瘤的风险。而且, 已报道在人和实验动物中 PAHs具有生殖毒性、发育毒性、血液毒性、心脏毒性、神经毒性和免疫毒性^[5]。职业 PAHs接触与暴露涉及更多的行业与场合, 接触浓度与暴露剂量更大。由于 PAHs的暴露途径多种多样及个体差异, 仅用外暴露法并不能准确地估计个体实际暴露的剂量, 且采样和分析的工作量大, 故以生物标志物法来综合评价人体对 PAHs的暴露及危险程度具有非常重要的意义。

1 OH-PAHs作为 PAHs生物标志物的意义

生物标志物法可通过检测人体组织或体液中的 PAHs或其代谢产物来综合反映人体对多介质、多途径 PAHs的暴露情

况, 采样和分析的工作量小。目前可用来指示人体接受 PAHs暴露的生物标志物主要有: 尿中 PAHs代谢产物、尿中硫酸酯、尿中致突变物质、PAH-DNA加合物及 PAH蛋白质加合物等^[6]。尿中硫酸酯和尿中致突变物质是暴露于致突变物质的非特异性指标。PAH-DNA加合物及 PAH蛋白质加合物在职业接触多环芳烃和吸烟情况下缺乏敏感性, 易受其他因素干扰。PAH-DNA加合物作为暴露的生物标志物方面已有很多研究, 针对以白细胞作为目标 DNA的替代物已经提出酶免疫分析法和³²P后标记法分析 PAH-DNA加合物。但以上几种方法受制于可估计的变异限制了其应用。PAHs暴露和 PAH-DNA加合物之间尚未建立明确的关系, 此外目前后标记法操作也存在一定难度。尿液中 PAHs代谢产物不受肠道细菌影响, 大都以葡萄糖醛酸和硫酸结合物的形式存在^[7], 且其荧光强度高, 1-羟基芘 (1-OHP) 的葡萄糖醛酸酯也被提出用作 PAHs暴露的生物标志物。随着研究的深入, 现在用酶水解法、酸水解法和碱水解法得到游离的 OH-PAHs的技术已相当成熟。此外, 由于尿液容易获得和保存并且具有非侵入和无破坏性, OH-PAHs可以有效反映近期 PAHs多途径的暴露, 近年来已成为研究的热点。

1-OHP可以衡量个体短期 PAHs的实际暴露水平^[8], 是目前使用最广泛的 PAHs代谢物的生物标志物。大气中 PY占总 PAHs的 2%~10%, 且此比例较稳定, 故 PY的浓度不仅表达了 PY的摄入量并且间接指示了总 PAHs的摄入量^[7]。多年研究表明, 尿中 1-OHP浓度与空气中 PAHs浓度有较高的一致性且含量易测定。OH-PAHs种类繁多, 除 1-OHP外, OHPhc(包括 1-, 2-, 3-, 4-, 9-OHP)c及 1-OHNa^c和 2-OHNa^c近年来也常常

收稿日期: 2010-06-25 修回日期: 2010-08-30

基金项目: 国家自然科学基金 (NSFC20807002); 国家环境保护部环保公益性行业科研专项 (200709048)

作者简介: 秦晓蕾 (1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 职业卫生与职业医学。

*: 通讯作者, 讲师, 研究方向: 职业卫生与职业医学、环境健康, zhangliwen@tjmu.edu.cn

被用作 PAHs 代谢物的生物标志物。已有报道采用 GC-MS 和 HPLC 测定各种羟基菲作为暴露的生物标志物, 然而样品的净化还存在一定的难度。此外, 由于尿中 3-OHBAp 是强致癌性 PAHs 的代表化合物 BaP 的直接代谢产物, 能直观反映 PAHs 暴露与肿瘤发生之间的关系, 所以关于尿中 3-OHBAp 作为人体暴露 PAHs 生物标志物的可行性研究一直以来也是研究的焦点, 但是高沸点多环芳烃的代谢产物主要通过粪便排泄, 尿中的浓度非常低, 分析起来有一定的难度。系统回顾 PAHs 的各种生物标志物后表明尿中 1-OHP 是评估个体 PAHs 暴露较好的生物指标^[6]。

2 OH-PAHs 分析方法

2.1 前处理方法

2.1.1 水解方法 由于尿中 PAHs 的代谢物 OH-PAHs 多以与葡萄糖醛酸结合物的形式存在, 故首先应使 OH-PAHs 成为游离状态再测定。解离方法有酶水解法、碱水解法和酸水解法。目前酶水解法应用最多。酶水解法使用 β -葡萄糖苷酸水解酶进行水解, 影响水解程度的因素有: 酶的用量、体系的 pH 值、水解温度和水解时间; 碱水解法利用 NaOH 进行水解, 水解程度取决于碱的用量、水解温度及水解时间; 酸水解法利用 HC 进行水解, 水解程度取决于酸的用量、水解温度及水解时间。

Jongeneelen^[6]建立了酶水解法的 1-OHP 前处理方法, 尿液首先添加 HCl (1 mol/L) 和醋酸盐缓冲液调节 pH 为 5.0 而后添加 β -葡萄糖苷酸水解酶/芳基硫酸酯酶 (100 U/m¹_{尿液})

37℃ 下振摇水解过夜。杨雪茹等^[9]对酶水解条件进行了探索性的优化, 结果表明 H₁ 型 β -葡萄糖苷酸水解酶最佳添加量为 400 U/m¹_{尿液}, 水解时间超 2 h 即可以认为完全水解。段小丽^[10]对酶水解体系进行了条件实验, 结果表明最佳酶用量为 173.8 U β -葡萄糖苷酸水解酶/m¹_{尿液}、4.42 U 芳基硫酸酯酶/m¹_{尿液}, 水解 4 h 以上即可水解完全。Wegenet^[11]对一直以来沿用的 Jongeneelen^[6]酶水解参数提出了质疑, 通过正交化条件实验得出如下结论: 酶用量在 125 Fishman U/m¹_{尿液} 情形下水解时间为 2 h 2 次 2 h 16 h 和 24 h 水解效率分别为 5%、13%、70%、84%, 当酶用量增加至 2000 Fishman U/m¹_{尿液} 时 16 h 和 24 h 水解效果都达到 100%。8 倍酶用量的增加带来 30% 回收效率的提高, 此时需要衡量经济与否来确定酶的用量与水解时间的关系。

李晓华^[12]建立了碱水解——液液分配的 1-OHP 前处理方法, 该方法测定简单方便并且准确度较高。通过正交实验发现: 最佳加碱量为 0.15~0.26 NaOH (50%) 溶液/m¹_{尿液}; 水解时间超过 3 h 后水解效率不再明显增加; 水解效率随温度增高而增加, 但超过 100℃ 后溶液沸腾无实际意义, 故选择水解温度为 100℃。

Keiming^[13]率先建立了猪尿中 1-OHP 的酸水解-HPLC 分析方法, 此后 Hongwen Chen^[14]将酸水解法应用到人尿中 1-OHP 的测定, 向 50 ml 尿样中加入 6 mol/L 的 HC 溶液, 在 100℃、800 r/min 的转速下搅拌加热 1 h

3 种水解法的区别详见表 1

表 1 酶水解法、碱水解法和酸水解法的区别

方法	具体操作	优点	缺点
酶水解法	β -葡萄糖苷酸水解酶; 添加量: 200 U/m ¹ pH=5.5; 水解温度: 37℃; 水解时间: 16 h	37℃ 下 pH 值 5.5 的溶液中 β -葡萄糖苷酸水解酶的活性最高, 水解反应进行的比较彻底, OH-PAHs 水解完全, 水浴摇床的温度比碱水解法要低, 目标物质损失较少	水解反应需要的酶量多、水解时间长; 酶的花费比较大; 酶活性存在差异, 方法重现性差
碱水解法	50% 的 NaOH 溶液; 添加量: 0.18 U/m ¹ pH=5; 水解温度: 100℃; 水解时间: 3.5 h	水解反应 NaOH 的用量少、水解时间短; 无需水解酶和固相萃取小柱, 也不需要液相梯度洗脱	水浴摇床的温度较高, 目标物质有损失
酸水解法	6 mol/L HC 溶液; 水解温度: 100℃; 水解时间: 1 h	水解时间最短, 省时	水浴摇床的温度较高, 目标物质有损失

2.1.2 净化方法 尿液基体是由许多有机物和无机物组成的混合物, 在进行仪器分析前需进一步净化以尽可能的减少杂质给分析带来的干扰。一般采用 C₁₈ 小柱对 OH-PAHs 进行净化。段小丽^[10]对照了 3 种固相萃取柱 (C₁₈ 小柱、Frisil 小柱及硅胶小柱) 的净化效率, 结果表明 C₁₈ 小柱回收率最高, 淋洗液优化实验表明甲醇的洗脱效果优于二氯甲烷。固相萃取操作简便、快速、费用低, 易于实现自动化及与其他分析仪器的联用, 所需有机溶剂量少, 但固相萃取是一个耗时、多阶段并需要浓缩的处理过程, 可能导致挥发性目标物质的损失。在固相萃取的基础上发展了自动固相萃取和固相微萃取。Pawliszyri^[15]发明了集采样、萃取、浓缩、进样于一体的固相微萃取技术。具有操作简单、省时、易行, 无需有机溶剂, 易于实现自动化, 且 SIME 熔融石英纤维可以重复使用

上百次而降低成本, 并提高检测限等优点。适用于分析环境、生物和食物样品中挥发性和半挥发性的有机化合物。但 SIME 的回收率低, 要求检测器的灵敏度较高, 仪器费用较高。

液液萃取技术也可将水解后的目标物质加以净化, 李晓华^[12]研究了乙酸乙酯、二氯甲烷、苯及异丙醚 4 种萃取溶剂的效率, 综合考虑效率、抗干扰能力等认为二氯甲烷具有较好的提取效率。液液萃取回收率高、选择性强、分离效果好和适应性强, 但液液萃取是一个耗时、耗力、复杂的操作过程, 每一步操作, 尤其是浓缩都可能引入误差, 在分析挥发性化合物时可能损失部分目标物质, 同时溶剂的回收处理增加了分析成本。

免疫亲和色谱 (IAC) 是一种高效能、选择性强、灵敏度高的样品前处理方法, 是利用被测物的反应原性、抗原抗

体结合的特异性以及抗原抗体复合物在一定条件下能可逆解离的性质进行色谱分离。可以大大简化提取、净化、衍生化等前处理过程,同时可以将样品中理化性质相近的化合物有效地去除,分析结果更加准确和可靠。IAC柱用一定缓冲液冲洗后可以重复利用,降低了成本。但是大量性质均一的纯化抗体的供应和非特异性吸附仍是待解决的难题。

2.1.3 浓缩方式 段小丽^[10]对比了氮吹浓缩与旋转蒸发浓缩二者之间的回收率差异,对于1-OHP而言差别不大,但对于9-OHBaP和3-OHBaP而言氮吹浓缩明显具有较高的回收率。

2.2 分析方法

尿中OH-PAHs的分析方法主要有液相色谱及联用技术、气相色谱及联用技术、同步荧光光谱、毛细管区带电泳、伏安法及酶联免疫法等,下文分别详加阐述。

2.2.1 液相色谱及联用技术分析 由于1-OHP等PAHs的羟基化合物具有一定的荧光性,基于这一特性Jongeneel^[6]建立了1-OHP的高效液相色谱-荧光检测(HPLC-FD)分析法。此后,Holjender^[16]建立了可同时分析3-OHPh_e、1-OHP和3-OHBaP的HPLC-FD方法,检出限为0.02~0.19 nmol/L。段小丽^[10]建立了1-OHP、3-9-OHBaP 3种OH-PAHs的HPLC-FD分析方法,最低检测限可达0.02~0.05 μg/L,回收率为70%~85%;Gündel^[17]则分析了尿液中的3-OHBaP和3-OHBaA。岳强^[18]实现了10种OH-PAHs的同时检出,包括1-OHNaP、2-OHNaP、2-OHFlu、2-OHPh_e、3-OHPh_e、4-OHPh_e、9-OHPh_e、1-OHP、6-OHCh和3-OHBaP。除3-OHBaP外,9种OH-PAH的回收率在75%~98%之间,检测限在0.23~0.93 μg/L之间。HPLC方法简单快速,适用于大量样品的分析,但HPLC的分离能力有限,1、9-OHPh_e和2、3-OHPh_e等同分异构体在色谱柱中存在共溢出,无法成功分离,且尿样基质干扰大,检测限较高。

范瑞芳^[19]在HPLC法基础上发展了OH-PAHs的液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)分析方法。研究发现ESI负源模式比APCI正源模式更适合尿中PAHs羟基代谢物的定性定量分析。使用APCI源可以分析1-OHP、3-OHBaP 2种PAHs代谢物,分析时间短,适合大量样品的快速检测;使用ESI负源模式,可分析尿中10种PAHs代谢物,可用于PAHs的联合检测。其中2-OHPh_e和3-OHPh_e部分分离,1-OHPh_e和9-OHPh_e在色谱柱中共溢出。负源模式10种OH-PAHs的检测限为0.037~0.062 μg/L。Onyemawu^[20]使用LC-MS/MS负离子模式对尿液中1羟基PAHs代谢物进行定量分析,该方法可同时测定3 m尿液中的16种OH-PAHs化合物,检测限低至0.002~0.01 μg/L,回收率71%~94%。HPLC-MS方法避免了GC-MS法繁琐的衍生化过程,且多离子反应模式的应用减少了HPLC-FD分析过程中基质的杂质干扰,具有特异选择性,使检测限明显降低,是定量检测人体PAHs羟基代谢物的高效、实用的方法,但是1、9-OHPh_e和2、3-OHPh_e在色谱柱中仍存在共溢出。

2.2.2 气相色谱及联用技术分析 Grimmer^[21]首先建立了气相色谱-质谱联用(GC-MS)分析OH-PAHs的方法,该方

法中样品经前处理后,用二氯甲烷提取目标物质,经过衍生化处理后通过气相色谱进行分离再用质谱仪进行分析测定。Gmeiner^[22]使用固相微萃取双甲基甲硅烷基三氟乙酰胺(BSIFA)衍生化-GC/MS分析10种OH-PAHs化合物,检测限为0.03~0.23 μg/L。Camp^[23]建立的OH-PAHs的GC-MS分析方法可同时检测12种羟基PAHs代谢物。尿样经酶水解后,经固相萃取净化并浓缩后,以BSIFA进行衍生化处理,后利用GC-MS进行分析。方法的检测限为0.1~1.4 ng/L,回收率为84%(除了6-OHCh和3-OHBaP的回收率低于40%),精密度的精度为低于20%。GC-MS方法具有较高的灵敏度,且可以检测多种羟基PAHs代谢物,并可解决2-OHPh_e和3-OHPh_e及1-OHPh_e和9-OHPh_e在色谱柱中共溢出的问题,但需要的尿量比较大,操作较复杂,且使用的溶剂苯和衍生剂重氮甲烷具有潜在毒性和危险性。

随着高分辨率质谱的发展,出现了使用HRMS分析OH-PAHs的方法,可以同时最多检测24种单羟基PAHs代谢物。Smith等^[24]研究了气相色谱-高分辨率质谱联用技术(GC-HRMS)分析16种OH-PAHs,检测限在2~43.5 ng/L,回收率为40%~70%。Li^[25]建立的OH-PAHs的GC/D/HRMS分析方法可同时测定尿液中24种OH-PAHs,通过叠氮基三甲基硅烷衍生化后再用同位素稀释质谱进行定量,检出限低于7 pg/ml(除1,2-萘酚外),回收率为66%~72%,精密度的精度为10%。该方法灵敏度高,可以彻底分离几种OHPh_e,但是前处理过程同样比较复杂且仪器较昂贵。

GC分析的重点是样品的衍生化过程,因为衍生化可以产生挥发性衍生物适合GC分析,常用的衍生剂包括BSIFA、甲基三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺(MSIFA)、三硅酸镁等。衍生过程常在60℃孵化1 h。

HPLC-MS和GC-MS目前应用较多,HPLC-MS快速、简便、高效、实用,样品无需衍生化处理,适用于大量样品的快速检测,但几种羟基菲分离不彻底。GC-MS灵敏度高,可以同时分离OH-PAHs的种类比HPLC多,解决了HPLC分析中几种羟基菲分离不彻底的问题,但需要的尿量比较大,操作复杂,且使用的溶剂苯和衍生剂重氮甲烷具有潜在毒性和危险性。

2.2.3 同步荧光技术分析 赵振华等^[26]建立了同步荧光分析OH-PAHs的方法。同步荧光测定法的原理是先用溶剂将尿样中的1-OHP萃取到有机相中,再用NaOH水溶液从有机相中萃取1-OHP,用同步荧光光谱仪进行测定,避免了溶剂消耗较大的HPLC测定方法。通过多次实验,发现1-OHP在碱性溶液中,Δλ为35 nm时可获得较理想的同步荧光光谱。尿样经过预处理后进行同步荧光光谱扫描,λ_{ex}315 nm,λ_{em}405 nm,起始扫描,峰值在440 nm,用窄基线法进行定量测定。荧光分析是灵敏度极高的一种痕量分析方法,当溶液中1-OHP浓度大于1 mg/m³时,由于内滤光效应而使谱图失真,溶液浓度在500 ng/ml至0.5 ng/ml时可获得最好的结果。本法的检测限为0.05 ng/ml,精密度的精度为8.0%。1-OHP的浓度为5 ng/m³时回收率为81.6%,1-OHP的浓度为2 ng/m³时回收率为83.5%。但部分样品因不明干扰影响测定,特别是在

0.3 ng/m 浓度以下的尿样。Cheo H Koo Lee 等^[27]利用免疫色谱-同步荧光分析法 (IAC-SFS) 测定了 OH-PAHs 免疫亲和柱用多配制柱填装溴化氰活化的琼脂糖凝胶和可以识别几种 PAHs 代谢物包括 1-OHPG 的单克隆抗体 8E11。样品过柱后分别用磷酸盐缓冲溶液和 25% 的甲醇磷酸盐缓冲溶液淋洗柱子, 用 55% 的甲醇磷酸盐缓冲溶液洗脱 1-OHPG。洗脱液在 65℃、真空的条件下浓缩近干, 残渣用水溶解, 用 SFS 分析。激发和发射波长根据分析物的荧光光谱特征确定。Kang 等^[28]建立了运用同步荧光法 1 次扫描同时测定 5 种 OH-PAHs 的方法, 该方法以 Tween80 为增敏剂检测限可达 10^{-10} mol/L 级。

同步荧光法的优点为快速、简单、经济, 可以节省总分析时间并且不需要溶剂和固相萃取、液液萃取等过程, 故可应用于大规模的低水平 PAHs 暴露的流行病学研究。

2.2.4 毛细管区带电泳技术分析 Xu Xin 等^[29]建立的毛细管区带电泳 (CZE) 分析尿液中 OH-PAHs 的方法是在检测器的末端连接阴极的常规模式下进行的。流体注射时间为 2 s, 在熔融毛细管中使用液体冷却剂来保持毛细管的温度, 254 nm 处进行紫外吸光度检测。由于样品溶液中甲醇的含量相对较高, 为了确保样品填料和流动缓冲液的逐渐混合及降低区带扩展的可能性, 电压以 2.5 min 次的变化速度从 0V 线性增加到 25kV。方法的优点为简单、快速和便于使用。

2.2.5 伏安法 在 OH-PAHs 的众多分析方法中电化学方法是一种相对简单和价廉的选择。溶出伏安法是一种基于对 1-OHP 的电化学特性而提出的在悬汞电极吸附富集的痕量测定 1-OHP 的新方法。溶出伏安法的工作电极包括汞电极 (悬汞电极和汞膜电极) 和非汞电极 (玻碳、石墨和碳糊电极)。Amado A Castro 等^[30]研究了用这种汞电极检测 1-OHP。具体方法为向尿样中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 待盐完全溶解后离心尿液, 上清液转移到用甲醇和水预处理过的 C18 小柱, 然后用甲醇洗脱。洗脱液用氮气流浓缩后用盐酸水-甲醇 (1:1) 混合液溶解残渣, 在 60℃ 搅拌水解, 取 1 ml 进行伏安测定。方法的优点为联合分析的费用比 HPLC 和 GC-MS 低几个数量级, 检测限为 0.23 PPb (1.06×10^{-9} mol/L) 和 HPLC 具有可比性。

电化学分析的灵敏度和选择性可能通过使用化学修饰电极而得到强化, 环糊精经常用作电极修饰因子。A Ferancova 等^[31]基于差动脉冲伏安法用环糊精的衍生物修饰的碳糊电极和丝网印刷电极伏安测定 1-OHP。该方法的原理: 1-OHP 在电极表面的富集是通过络合作用形成环糊精和 1-OHP 的超分子复合物, 1-OHP 在碳糊电极和丝网印刷电极均表现一步氧化, 1-OHP 的差动脉冲伏安信号 90 s 后达到饱和水平。单体 β 环糊精作为碳糊电极的修饰因子时可以引起 1-OHP 信号的明显增强。方法的优点为差动脉冲伏安法应用环糊精修饰的电极在检测 1-OHP 的电活性方面具有优势, 诸如增强了灵敏度、简单、快速、重现性好, 并且单用不基于汞的丝网印刷电极传感器和利用商业可得的环糊精费用低廉。

2.2.6 酶联免疫法 Diemar Knopp 等人^[32]发展了用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定尿中 PAHs 代谢物的方法。酶联免疫吸附测定法是用涂渍牛血清白蛋白结合物的聚苯乙烯微量滴

定平板在 55℃ 缓冲溶液中过夜。平板用磷酸盐缓冲溶液清洗后, 没有被涂渍的抗原占据的位点用封闭缓冲液在室温下摇动封闭 1 h。平板第二次清洗后加入尿样或标样和稀释的抗血清在室温下搅动培育 30 min。平板第三次清洗后加入羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶结合物培育 1 h。平板最后一次清洗后加入底物溶液, 用 5% 的硫酸停止酶反应, 在 450 nm 处测吸光度。1-OHP 的校准曲线在 $0.05 \sim 2 \mu\text{g/L}$ 范围内是线性的, 半抑制浓度为 $0.4 \mu\text{g/L}$, 检测限为 $0.02 \mu\text{g/L}$, 平均变异系数为 4.5%, 超出标准曲线范围的平板内和平板间测定的精密度为 7.3%。方法的优点为简单、省时、省钱, 与气相色谱具有可比的灵敏度, 特异性强, 可以避免耗时的酶水解前处理过程。缺点为交叉反应性研究表明酶联免疫吸附测定法不能产生与 PAHs 同分异构代谢物的概述浓度相符的信号, 并稍微有些低估, 方法的特异性差。与成对柱高效液相色谱测定的 1-OHP 和 OHPh 的总数相比酶联免疫吸附测定法测定的 1-OHP 等价物的浓度明显低。相反, 当酶联免疫吸附测定法的信号与单一代谢物的浓度相比会发现普遍被过高估计。

3 结语

OH-PAH 的分析方法中 HPLC 研究最多, 但 1-OHP 和 9-CHPh 2-OHP 和 3-OHP 在分离过程中共溢出, 分离不彻底, 尿样基质中的杂质有干扰, 且检测限过高; 改良的高效液相色谱虽优化了高效液相色谱的前处理过程, 使前处理的操作更为简便、快捷, 处理效果更好, 但仍未解决分离不彻底及检测限过高的问题。GC-MS 解决了几种 OHPh 分离不彻底的问题, 但在分析前需进行衍生化处理, 处理过程繁琐、耗时; GC-HRMS 的灵敏度高, 但分析费用较高; HPLC-MS/MS 避免了 GC-MS 繁琐的衍生化处理和基质中杂质的干扰, 明显降低了检测限, 但几种 OHPh 仍分离不彻底。吸附溶出伏安法适用于 1-OHP 的痕量分析, 其检测限和 HPLC 具有可比性, 且分析费用比 HPLC 和 GC-MS 低很多; ELISA 操作简单、省时、省钱, 具有与气相色谱相近的灵敏度, 可以避免耗时的酶水解前处理过程, 但是由于其他多环芳烃以 BaP 代谢产物与抗体之间的交叉反应, 使 ELISA 分析特异性差。

通过比较可以发现, 不同分析方法各有其显著的优缺点, 同时分析精度与灵敏度、分析测试耗时和分析费用成为互相抵触的两个方面, 针对不同的研究目标选择合适的分析方法才能使各方面达到最优。此外, 应致力于发展一种既简单、快捷又可以将同分异构体彻底分离, 并且检测限更低的分析方法。近几年来, 仪器分析领域飞速发展, 超高效液相色谱与飞行时间质谱 (UPLC-TOFMS)、二维气相色谱 (GC×GC)、毛细管电色谱、激光诱导荧光、石英晶体微天平 (QCM) 等多种新兴分析方法逐渐成熟, 未来可以将这些方法应用到 OH-PAH 的分析中。

参考文献:

- [1] 黄进, 魏世强. 多环芳烃的环境效应及其生物标志物在环境风险评估中的应用 [J]. 河南预防医学, 2003, 14 (6): 370-374
- [2] Xu S, Liu W, Tao S. Enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in China [J]. Environ Sci Technol, 2006, 40 (3): 702-708.

- [3] 殷征宇, 胡云平, 金泰虞. 多环芳烃的生物接触标志物与其代谢酶的基因多态性 [J]. 劳动医学, 2001 18 (4): 240-243
- [4] TC AT Hk. Urinary 2-hydroxyfluorene and 1-hydroxypyrene levels in smokers and nonsmokers in Japan and Thailand [J]. *Polycyclic Aromatic Comp* 2004 24 467-474
- [5] Li Z Sandau CD Romanoff LC. Concentration and Profile of 22 urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in the US population [J]. *Environmental Research* 2008 107 (3): 320-331
- [6] Jongeneelen F J. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Annals of Occupational Hygiene* 2001 45 (1): 3-13.
- [7] 牛红云, 蔡亚岐, 魏复盛. 多环芳烃暴露的生物标志物 尿中羟基多环芳烃 [J]. 化学进展, 2006 18 (10): 1381-1390
- [8] 范瑞芳, 方展强, 于志强. 人尿中多环芳烃羟基代谢物的测定及暴露水平研究进展 [J]. 环境与健康, 2008 25 (12): 1114-1118
- [9] 杨雪茹, 黄金芝, 李涛. 尿中 1 羟基芘测定方法的研究 [J]. 工业卫生与职业病, 1997 23 (5): 278-280
- [10] 段小丽, 杨洪彪, 张林. 尿液中多环芳烃羟基代谢产物分析方法研究 [J]. 环境科学研究, 2004 17 (3): 62-65
- [11] Wegener JW M Hofman Abbels GH J Van Velzen M. Improved glucuronide hydrolysis in the determination of urinary 1-hydroxypyrene [J]. *Journal of Chromatography A* 2006 1134(1-2): 232-235.
- [12] 李晓华, 缪引林, 王敢峰. 碱水解法测定尿中 1 羟基芘的样品前处理技术 [J]. 中华预防医学杂志, 1994 28(4): 228-229
- [13] Keim ing SD Kirby KW Morgan DP. Identification of 1-hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine [J]. *Xenobiotica* 1983 13: 415-419
- [14] Hong Wen Chen. Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by acid hydrolysis coupled to solid-phase microextraction and semimicro column liquid chromatography [J]. *Analytical Sciences* 2007 23: 1222-1225
- [15] Bełardi R G Pawliszyn J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and the rapid transfer to capillary columns [J]. *Water Pollut Res J Can* 1989 24: 179
- [16] Hollender J Koch B Dett W. Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene pyrene and benzo[a]pyrene hydroxides [J]. *Journal of Chromatography B* 2000 739 (1): 225-229.
- [17] Gundel J Angerer J. High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the determination of 3-hydroxybenzo[a]pyrene and 3-hydroxybenzo[a]anthracene in the urine of polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed workers [J]. *Journal of Chromatography B* 2000 738 (1): 47-55.
- [18] 岳强, 王德超, 于志强. 人尿样中 10 种羟基多环芳烃同时检测 [J]. 中国公共卫生, 2009 25 (4): 443-444
- [19] Fan R Dong Y Zhang W. Fast simultaneous determination of urinary 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B* 2006 836 (1-2): 92-97
- [20] Onyemaawa F Rappaport SM Sobus JR. Using liquid chromatography tandem mass spectrometry to quantify mono hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009 877 (11-12): 1117-1125
- [21] Grimmer G Jacob J Dettham G. Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers [J]. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 1997 69 (4): 231-239
- [22] Gmeiner G Krassig C Schmid E. Fast screening method for the profile analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in urine using derivatization, solid-phase microextraction [J]. *Journal of Chromatography B* 1998 705 (1): 132-138
- [23] Cao P L Rossella F. Fusion and Development of a gas chromatography/mass spectrometry method to quantify several urinary monohydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in occupationally exposed subjects [J]. *Journal of Chromatography B* 2008 875531-875540
- [24] Smith C J Walcott C J Huang W L. Determination of selected monohydroxylated metabolites of 2-, 3- and 4- ring polycyclic aromatic hydrocarbons in urine by solid-phase microextraction and isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002 778 (1-2): 157-164
- [25] Li Z Romanoff LC Trinidad DA. Measurement of urinary monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons using automated liquid-liquid extraction and gas chromatography/isotope dilution high-resolution mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry* 2006 78(16): 5744-5751.
- [26] 赵振华, 田德海, 全文熠. 尿中 1 羟基芘的同步荧光测定法 [J]. 环境化学, 1994 13 (2): 141-145
- [27] Lee CK Cho SH Kang JW. Comparison of three analytical methods for 1-hydroxypyrene glucuronide in urine after non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Toxicology Letters* 1999 108 (2-3): 209-215
- [28] Kang R H Wang Y S Yang H M. Rapid simultaneous analysis of 1-hydroxypyrene 2-hydroxyfluorene 9-hydroxyphenanthrene 1- and 2-naphthol in urine by first derivative synchronous fluorescence spectrometry using Tween-20 as a sensitizer [J]. *Analytica Chimica Acta* 2010 685 (2): 180-186
- [29] Xu X Hurubise R J. Influence of organic solvents in the capillary zone electrophoresis of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites [J]. *Journal of Chromatography A* 1999 829(1-2): 289-299.
- [30] Castro A A Wegener A D R Farias P A M. Adsorptive stripping voltammetry of 1-hydroxypyrene at the thin film mercury electrode basis for quantitative determination of PAH metabolite in biological materials [J]. *Analytica Chimica Acta* 2004 521 (2): 201-207
- [31] Ferancov A Buckov M Kozlov E. Association interaction and voltametric determination of 1-anthropyrene and 1-hydroxypyrene at cyclodextrin and DNA based electrochemical sensors [J]. *Bioelectrochemistry* 2005 67 (2): 191-197
- [32] Knopp D Schedl M A Chaz S. Immunochemical test to monitor human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons urine as sample source [J]. *Analytica Chimica Acta* 1999 399(1-2): 115-126