



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110806451 B

(45) 授权公告日 2022.04.19

(21) 申请号 201910984489.3

(22) 申请日 2019.10.16

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110806451 A

(43) 申请公布日 2020.02.18

(73) 专利权人 生态环境部南京环境科学研究所  
地址 210042 江苏省南京市玄武区蒋王庙街8号

(72) 发明人 张芹 宋宁慧 张圣虎 唐夫凯  
刘爱萍 卜元卿 王博 李栋  
王艺璇

(74) 专利代理机构 北京栈桥知识产权代理事务所(普通合伙) 11670  
代理人 刘婷

(51) Int. Cl.  
G01N 30/06 (2006.01)  
G01N 30/88 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 106841471 A, 2017.06.13  
CN 102841162 A, 2012.12.26  
KR 20160101450 A, 2016.08.25

Fanrong Zhao et al. Levels of Blood Organophosphorus Flame Retardants and Association with Changes in Human Sphingolipid Homeostasis.《Environ. Sci. Technol.》.2016,第50卷

LYNDA V. PODHORNIAK et al. Gas Chromatography with Pulsed Flame Photometric Detection Multiresidue Method for Organophosphate Pesticide and Metabolite Residues at the Parts-Per-Billion Level in Representative Commodities of Fruit and Vegetable Crop Groups.《JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL》.2001,第84卷(第3期), (续)

审查员 钟宇静

权利要求书2页 说明书9页 附图1页

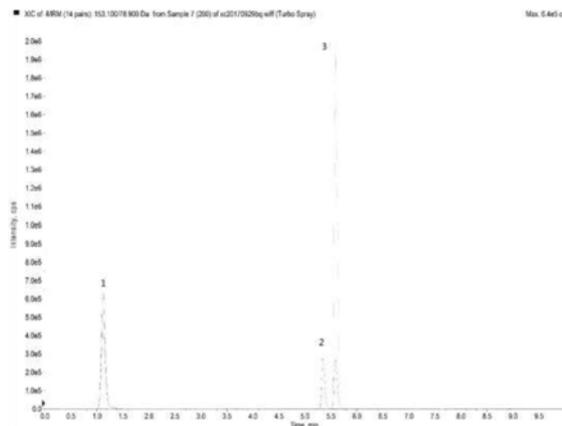
(54) 发明名称

一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法

(57) 摘要

本发明涉及血浆中污染物测定技术领域,具体是涉及一种测定血浆中有机磷酸酯的磷酸二酯代谢物含量的方法。本发明利用高效液相色谱-离子阱-三重四级杆质谱联用技术结合液液萃取和自制固相小柱萃取检测血浆中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯含量的方法。血浆样品经液液萃取和固相萃取净化,用高效液相色谱-质谱联用仪MRM监测离子模式分析,外标法定量。本发明的方法检出限低,稳定性好,回收率高,检测灵敏度高,用于人血浆中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯含量的测定,能够满足

人血浆中目标物残留的检测要求。



CN 110806451 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

Guanyong Su et al. Liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for determination of organophosphate diesters in bioticsamples including Great Lakes herring gull

plasma.《Journal of Chromatography A》.2014,第1374卷

李佩 等.液相色谱-串联质谱法测定尿液中7种有机磷酸酯代谢物.《分析化学》.2017,第45卷(第11期),

1. 一种测定血浆中有机磷酸酯 (OPEs) 的磷酸二酯代谢物含量的方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

S1: 血浆的改性:

取3mL血浆加入离心管中, 加入3mL甲酸, 混匀后平衡3小时, 加入9mL提取液震荡提取4-6小时;

S2: 样品前处理:

将样品离心分离, 取出上层有机相, 将下层血浆、水和甲酸的混合相加入9mL提取液, 震荡提取30min, 重复此步骤一次, 合并有机相, 过无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 除去水分后, 旋转蒸发至干, 将溶剂置换为5mL乙腈;

玻璃小柱中从下到上依次装填100mg N-丙基乙二胺固相吸附剂PSA、20mg石墨化炭黑GCB, 4g无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 以5mL乙腈预淋洗, 将5mL乙腈提取液缓慢上样, 过玻璃小柱, 收集滤液, 再以5mL乙腈洗脱, 合并两次洗脱液, 用缓慢氮气吹至近干, 以1mL乙腈定容, 待LC-MS/MS测定;

S3: 配制混合标准溶液:

a. 配制单标准储备液: 将磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯用乙腈配制成质量浓度为10mg/L的单标准储备液, 储存于4℃环境下备用;

b. 配制混合标准储备液: 准确吸取200 $\mu\text{L}$ 各单标准储备液于10mL容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 配制质量浓度为200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准储备液, 于4℃下保存;

c. 用乙腈作为溶剂, 将上述混合标准储备液按比例稀释后配成质量浓度分别为0.2、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液, 于4℃下保存;

S4: 绘制标准曲线:

用甲醇配制质量浓度分别为0.2, 1, 2, 5, 10, 20, 50和100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液, 以峰面积 (y) 对目标物的质量浓度 (x) 绘制标准曲线;

S5: 高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析;

S6: 外标法定量:

通过步骤S5分析后, 根据绘制的色谱图计算出样品溶液的峰面积, 并通过步骤S2所述的标准曲线计算出样品溶液中的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度, 目标物在1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好的线性关系, 以信噪比 $S/N=3$ 计算仪器方法检出限,  $S/N=10$ 计算仪器方法定量限, 同时对100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液连续测定3天, 每天测定3次, 计算日内和日间精密度;

所述提取液为正己烷和/或乙酸乙酯。

2. 根据权利要求1所述的一种测定血浆中有机磷酸酯 (OPEs) 的磷酸二酯代谢物含量的方法, 其特征在于, 所述步骤S1和S2中的提取液的浓度为15ng/ml~25ng/ml。

3. 根据权利要求1所述的一种测定血浆中有机磷酸酯 (OPEs) 的磷酸二酯代谢物含量的方法, 其特征在于, 所述步骤S1和S2中的提取液中还包含1-6ng/ml的活化液, 所述活化液为: AAILs, 所述AAILs具体为: L-脯氨酸离子液体 $[\text{C}_n\text{MIM}][\text{L-Pro}]$ ,  $n=2, 4, 6, 8$ 。

4. 根据权利要求1所述的一种测定血浆中有机磷酸酯 (OPEs) 的磷酸二酯代谢物含量的方法, 其特征在于, 所述步骤S2中上样速度和洗脱速度分别为5mL/min及3mL/min。

5. 根据权利要求1所述的一种测定血浆中有机磷酸酯 (OPEs) 的磷酸二酯代谢物含

量的方法,其特征在于,所述步骤S1中震荡具体操作为:4℃下涡旋震荡4-6h。

6.根据权利要求1所述的一种测定血浆中有机磷酸酯(OPEs)的磷酸二酯代谢物含量的方法,其特征在于,所述步骤S2中震荡具体操作为:4℃下涡旋震荡30min。

7.根据权利要求1所述的一种测定血浆中有机磷酸酯(OPEs)的磷酸二酯代谢物含量的方法,其特征在于,所述高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析的条件为:

a.高效液相色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18;流动相:0.2%(V/V)甲酸(A)和甲醇(B);流速为0.3mL/min;柱温:30℃;进样体积:5uL;

b.质谱条件:选择电喷雾离子源负离子模式扫描,采用半自动进样方式,以5uL/min的流速将500ug/L的标准储备液分别注入离子源;选取对应的母离子峰,对其子离子进行二级质谱分析,得到碎片离子信息。

8.根据权利要求7所述的一种测定血浆中有机磷酸酯(OPEs)的磷酸二酯代谢物含量的方法,其特征在于,质谱分析过程中,离子源温度:500℃,离子喷雾电压:5500V;气帘气压力为206851.8Pa;喷雾气压力为241327.1Pa;辅助加热气压力为275802.4Pa。

## 一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物样品有机污染物检测技术领域,具体是涉及一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法。

### 背景技术

[0002] 随着《关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约》对于多氯联苯及多溴联苯醚等有机氯和有机溴系阻燃剂的禁用,有机磷酸酯(OPEs)阻燃剂作为替代阻燃剂,近年来得到了广泛的应用。由于OPEs通常以物理形式而不是化学形式添加到样品中,容易在产品的生产、运输和使用中释放到环境中。目前包括大气、水体及土壤等多个环境基质中都检出了OPEs的存在,尤其是室内环境积尘是OPEs的重要的“汇”,环境基质中的OPEs可以通过呼吸,经口等多种途径进入人体。部分OPEs例如TDCPP(磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯)和TPhP(磷酸三苯酯)会引发癌症、生殖缺陷或其他生殖危害,具有神经毒性和生殖毒性,其健康风险不容忽视。而OPEs进入人体后会脱去侧链代谢为磷酸二酯化合物如二烷基和二苯基类磷酸酯等代谢产物,已有研究表明OPEs在人体中的主要存在形式是以磷酸二苯酯等为主要代谢产物的磷酸二酯,因此检测人体血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量可以更好地深入评价人体内OPEs暴露水平。目前,关于OPEs的磷酸二酯代谢物检测方法较少,主要以气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)和液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)为主。由于OPEs代谢产物中含有羟基基团,极性相对较大,使用GC-MS/MS方法时需要将目标物进行衍生化预处理,之后再通过固相萃取纯化才能进样检测,该过程复杂且反应时间较长,不利于大批量尿液样本检测,而LC-MS/MS方法对于极性较强的物质具有较高的选择性和灵敏度,故在分析检测OPEs代谢物时首选LC-MS/MS检测方法,但该方法前处理技术和色谱分离尚处于研究阶段。

[0003] 针对以上现状,本发明人拟利用高效液相色谱-串联质谱检测法并结合液液萃取和固相萃取的前处理方法,建立一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法,可以满足快速筛查和检测要求。液相色谱-质谱联用法因具有高灵敏度和高选择性,抗干扰能力强,可以成为磷酸二酯类定性定量分析的有效工具。

### 发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题是:针对现有的检测方法存在一定的局限性,灵敏度不够高,抗干扰能力差等问题,提供一种测定沉积物样品中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的方法,该方法检出限低,稳定性好,基本能够满足血液样品中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的检测要求。

[0005] 本发明的技术方案是:

[0006] 一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法,包括以下步骤:

[0007] S1:血浆的改性:

[0008] 取3mL血浆加入离心管中,加入3mL甲酸,混匀后平衡3小时,加入9mL提取液震荡提取4-6小时;

[0009] S2:样品前处理:

[0010] 将样品离心分离,取出上层有机相,将下层血浆、水和甲酸的混合相加入9mL提取液,震荡提取30min,重复此步骤一次,合并有机相,过无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 除去水分后,旋转蒸发至干,将溶剂置换为5mL乙腈;

[0011] 玻璃小柱中从下到上依次装填100mg N-丙基乙二胺固相吸附剂PSA、20mg石墨化炭黑GCB,4g无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,以5mL乙腈预淋洗,将上述5mL乙腈提取液缓慢上样,过玻璃小柱,收集滤液,再以5mL乙腈洗脱,合并两次洗脱液,用缓慢氮气吹至近干,以1mL乙腈定容,待LC-MS/MS测定;

[0012] S3:配制混合标准溶液:

[0013] a. 配制单标准储备液(10mg/L):将磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯用乙腈配制成质量浓度为10mg/L的单标准储备液,储存于4℃环境下备用;

[0014] b. 配制混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ ):准确吸取200 $\mu\text{L}$ 各单标准储备液(10mg/L)于10mL容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制质量浓度为200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准储备液,于4℃下保存;

[0015] c. 用乙腈作为溶剂,将上述混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ )按比例稀释后配成质量浓度分别为0.2、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液,于4℃下保存;

[0016] S4:绘制标准曲线:

[0017] 用甲醇配制质量浓度分别为0.2, 1, 2, 5, 10, 20, 50和100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液,以峰面积(y)对目标物的质量浓度(x)绘制标准曲线;

[0018] S5:高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析;

[0019] S6:外标法定量:通过步骤S5分析后,根据绘制的色谱图计算出样品溶液的峰面积,并通过步骤S2所述的标准曲线计算出样品溶液中的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度,目标物在1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好的线性关系,以信噪比 $S/N=3$ 计算仪器方法检出限, $S/N=10$ 作为仪器方法定量限,同时对100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液连续测定3天,每天测定3次,计算日内和日间精密度。

[0020] 进一步地,在上述方案中,所述步骤S1和S2中的提取液为正己烷和/或乙酸乙酯。

[0021] 进一步地,在上述方案中,所述步骤S1和S2中的提取液的浓度为15ng/ml~25ng/ml。

[0022] 进一步地,在上述方案中,所述步骤S1和S2中的提取液中还包含1-6ng/ml的活化液,所述活化液为:AAILs(氨基酸离子液体),具体为:L-脯氨酸离子液体( $[\text{C}_n\text{MIM}][\text{L-Pro}]$ ,  $n=2, 4, 6, 8$ )。

[0023] 更进一步优选地,所述活化液为:Cu离子功能化的脯氨酸离子液体 $[\text{Cu}^{2+}(\text{L-Pro IL})_2]$ ,经验证,加入活化液能提升提取效果。

[0024] 进一步地,在上述方案中,所述步骤S2中上样速度和洗脱速度分别为5mL/min及3mL/min。

[0025] 进一步地,在上述方案中,所述步骤S1中震荡具体操作为:4℃下涡旋震荡4-6h。

[0026] 进一步地,在上述方案中,所述步骤S2中震荡具体操作为:4℃下涡旋震荡30min。

[0027] 进一步地,在上述方案中,所述高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析的

条件为:

[0028] a. 高效液相色谱条件: 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (150mm×2.1mm, 3.5μm); 流动相: 0.2% (V/V) 甲酸 (A) 和甲醇 (B); 流速为 0.3mL/min; 柱温: 30℃; 进样体积: 5μL;

[0029] b. 质谱条件: 选择电喷雾离子源负离子模式扫描, 采用半自动进样方式, 以 5μL/min 的流速将 500μg/L 的标准储备液分别注入离子源; 选取对应的母离子峰, 对其子离子进行二级质谱分析, 得到碎片离子信息。

[0030] 更进一步地, 在上述方案中, 所述质谱分析过程中, 离子源温度: 500℃, 离子喷雾电压: 5500V; 气帘气压力为 206 851.8Pa; 喷雾气压力为 241 327.1Pa; 辅助加热气压力为 275 802.4Pa。

[0031] 本发明的有益效果是: 相比于现有技术, 采用本发明方法能够大幅缩短提取时间, 提高检测的精确度, 检测灵敏度高, 抗干扰能力强, 检出限低, 回收率高, 稳定性好, 能够满足血液样品中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的检测要求。

## 附图说明

[0032] 图1是磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液 (100μg/L) 的总离子色谱图,

[0033] 其中图中1为磷酸二乙酯、2为磷酸二正丁酯, 3为磷酸二苯酯。

## 具体实施方式

[0034] 实施例1

[0035] 一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法, 包括以下步骤:

[0036] S1: 血浆的改性:

[0037] 取3mL血浆加入离心管中, 加入3mL甲酸, 混匀后平衡3小时, 加入9mL提取液 (正己烷15ng/ml) 震荡提取4小时;

[0038] S2: 样品前处理:

[0039] 将样品离心分离, 取出上层有机相, 将下层血浆、水和甲酸的混合相加入9mL提取液 (正己烷), 震荡提取30min, 重复此步骤一次, 合并有机相, 过无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>除去水分后, 旋转蒸发至干, 将溶剂置换为5mL乙腈;

[0040] 玻璃小柱中从下到上依次装填100mg N-丙基乙二胺固相吸附剂PSA、20mg石墨化炭黑GCB, 4g无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 以5mL乙腈预淋洗, 将上述5mL乙腈提取液5mL/min上样, 过玻璃小柱, 收集滤液, 再以5mL乙腈3mL/min洗脱, 合并两次洗脱液, 用缓慢氮气吹至近干, 以1mL乙腈定容, 待LC-MS/MS测定;

[0041] S3: 配制混合标准溶液:

[0042] a. 配制单标准储备液 (10mg/L): 将磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯用乙腈配制成质量浓度为10mg/L的单标准储备液, 储存于4℃环境下备用;

[0043] b. 配制混合标准储备液 (200μg/L): 准确吸取200μL各单标准储备液 (10mg/L) 于10mL容量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 配制质量浓度为200μg/L的混合标准储备液, 于4℃下保存;

[0044] c.用乙腈作为溶剂,将上述混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ )按比例稀释后配成质量浓度分别为0.2、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

[0045] S4:绘制标准曲线:

[0046] 用甲醇配制质量浓度分别为0.2,1,2,5,10,20,50和100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液,以峰面积(y)对目标物的质量浓度(x)绘制标准曲线;

[0047] S5:高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析;

[0048] 分析的条件为:

[0049] a.高效液相色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(150mm $\times$ 2.1mm,3.5 $\mu\text{m}$ );流动相:0.2%(V/V)甲酸(A)和甲醇(B);流速为0.3mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:5 $\mu\text{L}$ ;

[0050] b.质谱条件:选择电喷雾离子源负离子模式扫描,采用半自动进样方式,以5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准储备液分别注入离子源;选取对应的母离子峰,对其子离子进行二级质谱分析,得到碎片离子信息;

[0051] 质谱分析过程中,离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$ ,离子喷雾电压:5500V;气帘气压力为206851.8Pa;喷雾气压力为241327.1Pa;辅助加热气压力为275802.4Pa;

[0052] S6:外标法定量:通过步骤S5分析后,根据绘制的色谱图计算出样品溶液的峰面积,并通过步骤S2所述的标准曲线计算出样品溶液中的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度,目标物在1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好的线性关系,以信噪比S/N=3计算仪器方法检出限,S/N=10作为仪器方法定量限,同时对100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液连续测定3天,每天测定3次,计算日内和日间精密度。

[0053] 实施例2

[0054] 一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法,包括以下步骤:

[0055] S1:血浆的改性:

[0056] 取3mL血浆加入离心管中,加入3mL甲酸,混匀后平衡3小时,加入9mL提取液(乙酸乙酯20ng/ml)震荡提取5小时;

[0057] S2:样品前处理:

[0058] 将样品离心分离,取出上层有机相,将下层血浆、水和甲酸的混合相加入9mL提取液(乙酸乙酯),震荡提取30min,重复此步骤一次,合并有机相,过无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 除去水分后,旋转蒸发至干,将溶剂置换为5mL乙腈;

[0059] 玻璃小柱中从下到上依次装填100mg N-丙基乙二胺固相吸附剂PSA、20mg石墨化炭黑GCB,4g无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,以5mL乙腈预淋洗,将上述5mL乙腈提取液5mL/min上样,过玻璃小柱,收集滤液,再以5mL乙腈3mL/min洗脱,合并两次洗脱液,用缓慢氮气吹至近干,以1mL乙腈定容,待LC-MS/MS测定;

[0060] S3:配制混合标准溶液:

[0061] a.配制单标准储备液(10mg/L):将磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯用乙腈配制成质量浓度为10mg/L的单标准储备液,储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下备用;

[0062] b.配制混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ ):准确吸取200 $\mu\text{L}$ 各单标准储备液(10mg/L)于10mL容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制质量浓度为200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保

存;

[0063] c.用乙腈作为溶剂,将上述混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ )按比例稀释后配成质量浓度分别为0.2、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

[0064] S4:绘制标准曲线:

[0065] 用甲醇配制质量浓度分别为0.2, 1, 2, 5, 10, 20, 50和100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液,以峰面积(y)对目标物的质量浓度(x)绘制标准曲线;

[0066] S5:高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析;

[0067] 分析的条件为:

[0068] a.高效液相色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(150mm $\times$ 2.1mm,3.5 $\mu\text{m}$ );流动相:0.2% (V/V) 甲酸(A)和甲醇(B);流速为0.3mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:5 $\mu\text{L}$ ;

[0069] b.质谱条件:选择电喷雾离子源负离子模式扫描,采用半自动进样方式,以5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准储备液分别注入离子源;选取对应的母离子峰,对其子离子进行二级质谱分析,得到碎片离子信息;

[0070] 质谱分析过程中,离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$ ,离子喷雾电压:5500V;气帘气压力为206 851.8Pa;喷雾气压力为241 327.1Pa;辅助加热气压力为275 802.4Pa;

[0071] S6:外标法定量:通过步骤S5分析后,根据绘制的色谱图计算出样品溶液的峰面积,并通过步骤S2所述的标准曲线计算出样品溶液中的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度,目标物在1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好的线性关系,以信噪比S/N=3计算仪器方法检出限,S/N=10作为仪器方法定量限,同时对100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液连续测定3天,每天测定3次,计算日内和日间精密度。

[0072] 实施例3

[0073] 一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法,包括以下步骤:

[0074] S1:血浆的改性:

[0075] 取3mL血浆加入离心管中,加入3mL甲酸,混匀后平衡3小时,加入9mL提取液(正己烷25ng/ml和乙酸乙酯25ng/ml等体积比混合)震荡提取6小时;

[0076] S2:样品前处理:

[0077] 将样品离心分离,取出上层有机相,将下层血浆、水和甲酸的混合相加入9mL提取液(正己烷和乙酸乙酯等体积比混合),震荡提取30min,重复此步骤一次,合并有机相,过无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 除去水分后,旋转蒸发至干,将溶剂置换为5mL乙腈;

[0078] 玻璃小柱中从下到上依次装填100mg N-丙基乙二胺固相吸附剂PSA、20mg石墨化炭黑GCB,4g无水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,以5mL乙腈预淋洗,将上述5mL乙腈提取液5mL/min上样,过玻璃小柱,收集滤液,再以5mL乙腈3mL/min洗脱,合并两次洗脱液,用缓慢氮气吹至近干,以1mL乙腈定容,待LC-MS/MS测定;

[0079] S3:配制混合标准溶液:

[0080] a.配制单标准储备液(10mg/L):将磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯用乙腈配制成质量浓度为10mg/L的单标准储备液,储存于4 $^{\circ}\text{C}$ 环境下备用;

[0081] b.配制混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ ):准确吸取200 $\mu\text{L}$ 各单标准储备液(10mg/L)于

10mL容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制质量浓度为200 $\mu$ g/L的混合标准储备液,于4 $^{\circ}$ C下保存;

[0082] c.用乙腈作为溶剂,将上述混合标准储备液(200 $\mu$ g/L)按比例稀释后配成质量浓度分别为0.2、1、2、5、10、20、50、100 $\mu$ g/L的混合标准溶液,于4 $^{\circ}$ C下保存;

[0083] S4:绘制标准曲线:

[0084] 用甲醇配制质量浓度分别为0.2,1,2,5,10,20,50和100 $\mu$ g/L的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液,以峰面积(y)对目标物的质量浓度(x)绘制标准曲线;

[0085] S5:高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析;

[0086] 分析的条件为:

[0087] a.高效液相色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(150mm $\times$ 2.1mm,3.5 $\mu$ m);流动相:0.2%(V/V)甲酸(A)和甲醇(B);流速为0.3mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样体积:5 $\mu$ L;

[0088] b.质谱条件:选择电喷雾离子源负离子模式扫描,采用半自动进样方式,以5 $\mu$ L/min的流速将500 $\mu$ g/L的标准储备液分别注入离子源;选取对应的母离子峰,对其子离子进行二级质谱分析,得到碎片离子信息;

[0089] 质谱分析过程中,离子源温度:500 $^{\circ}$ C,离子喷雾电压:5500V;气帘气压力为206851.8Pa;喷雾气压力为241327.1Pa;辅助加热气压力为275802.4Pa;S6:外标法定量:通过步骤S5分析后,根据绘制的色谱图计算出样品溶液的峰面积,并通过步骤S2所述的标准曲线计算出样品溶液中的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度,目标物在1~100 $\mu$ g/L范围内呈良好的线性关系,以信噪比S/N=3计算仪器方法检出限,S/N=10作为仪器方法定量限,同时对100 $\mu$ g/L的标准溶液连续测定3天,每天测定3次,计算日内和日间精密度。

[0090] 实施例4

[0091] 一种测定血浆中OPEs的磷酸二酯代谢物含量的方法,包括以下步骤:

[0092] S1:血浆的改性:

[0093] 取3mL血浆加入离心管中,加入3mL甲酸,混匀后平衡3小时,加入9mL提取液(正己烷15ng/ml、乙酸乙酯20ng/ml、[Cu<sup>2+</sup>(L-Pro IL)<sub>2</sub>]6ng/ml)震荡提取6小时;

[0094] S2:样品前处理:

[0095] 将样品离心分离,取出上层有机相,将下层血浆、水和甲酸的混合相加入9mL提取液(正己烷和乙酸乙酯等体积比混合),震荡提取30min,重复此步骤一次,合并有机相,过无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>除去水分后,旋转蒸发至干,将溶剂置换为5mL乙腈;

[0096] 玻璃小柱中从下到上依次装填100mg N-丙基乙二胺固相吸附剂PSA、20mg石墨化炭黑GCB,4g无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,以5mL乙腈预淋洗,将上述5mL乙腈提取液5mL/min上样,过玻璃小柱,收集滤液,再以5mL乙腈3mL/min洗脱,合并两次洗脱液,用缓慢氮气吹至近干,以1mL乙腈定容,待LC-MS/MS测定;

[0097] S3:配制混合标准溶液:

[0098] a.配制单标准储备液(10mg/L):将磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯用乙腈配制成质量浓度为10mg/L的单标准储备液,储存于4 $^{\circ}$ C环境下备用;

[0099] b. 配制混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ ):准确吸取200 $\mu\text{L}$ 各单标准储备液(10 $\text{mg}/\text{L}$ )于10 $\text{mL}$ 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,配制质量浓度为200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

[0100] c. 用乙腈作为溶剂,将上述混合标准储备液(200 $\mu\text{g}/\text{L}$ )按比例稀释后配成质量浓度分别为0.2、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准溶液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存;

[0101] S4:绘制标准曲线:

[0102] 用甲醇配制质量浓度分别为0.2, 1, 2, 5, 10, 20, 50和100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯混合标准溶液,以峰面积(y)对目标物的质量浓度(x)绘制标准曲线;

[0103] S5:高效液相色谱质谱联用仪MRM监测离子模式分析;

[0104] 分析的条件为:

[0105] a. 高效液相色谱条件:色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18(150 $\text{mm}\times$ 2.1 $\text{mm}$ , 3.5 $\mu\text{m}$ );流动相:0.2% (V/V) 甲酸(A)和甲醇(B);流速为0.3 $\text{mL}/\text{min}$ ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:5 $\mu\text{L}$ ;

[0106] b. 质谱条件:选择电喷雾离子源负离子模式扫描,采用半自动进样方式,以5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准储备液分别注入离子源;选取对应的母离子峰,对其子离子进行二级质谱分析,得到碎片离子信息;

[0107] 质谱分析过程中,离子源温度:500 $^{\circ}\text{C}$ ,离子喷雾电压:5500V;气帘气压力为206 851.8Pa;喷雾气压力为241 327.1Pa;辅助加热气压力为275 802.4Pa;S6:外标法定量:通过步骤S5分析后,根据绘制的色谱图计算出样品溶液的峰面积,并通过步骤S2所述的标准曲线计算出样品溶液中的磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度,目标物在1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好的线性关系,以信噪比 $S/N=3$ 计算仪器方法检出限, $S/N=10$ 作为仪器方法定量限,同时对100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液连续测定3天,每天测定3次,计算日内和日间精密度。

[0108] 选用实施例2的方法数据对本发明做进一步的实验论证,以10个血液样品为例,测定血液中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的浓度,得到以下数据:

[0109] 1) 磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的线性方程、相关系数、日内和日间精密度、检出限和定量限,见表1:

[0110] 表1:磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的线性方程、相关系数、日内和日间精密度、检出限和定量限

化合物	回归曲线	相关系数 (R <sup>2</sup> )	日间偏差 RSD (% ,n=3)	日内 RSD (% ,n=3)	LOD ( $\mu\text{g/L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
磷酸二乙酯	y=18360 x+11032	0.997	5.82	4.34	0.33	1.10
[0111] 磷酸二正丁酯	y=8771x +1269	0.993	3.96	2.63	0.05	0.17
磷酸二苯酯	y=53074 x+20132	0.999	4.01	4.52	0.39	1.30

[0112] 2) 磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的参数及其LC-MS检测参数,见表2;

[0113] 表2:磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的参数及其LC-MS检测参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 /eV	去簇电压 /eV	入口电压 /eV	出口电压 /eV
磷酸二乙酯	153.1	78.9*	-24	-42	-10	-7
		124.7	-14	-42	-10	-7
[0114] 磷酸二正丁酯	210.0	78.8*	-7	-57	-34	-7
		153.8	-7	-57	-20	-7
磷酸二苯酯	248.9	92.6*	-43	-83	-7	-7
		155.2	-29	-83	-7	-7

[0115] 实验验证:

[0116] 1. 流动相的选择:一般情况下,碱性条件下可提高化合物[M-H]<sup>-</sup>的负离子响应,本实验采用ESI<sup>-</sup>模式,分别用乙腈-水溶液、甲醇-水溶液、甲醇-0.2%氨水溶液作为流动相,对磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯(100 $\mu\text{g/L}$ )的分离效果进行比较,其总离子流色谱图见图1。结果发现以甲醇-水为流动相时目标物峰的质谱响应和分离度比乙腈-水溶液更好,而添加氨水对目标物的分离影响不大,但是可以提高部分目标物的响应,因此选择甲醇-0.2%氨水溶液为流动相。

[0117] 2. 提取溶剂的选择:比较了常用提取试剂甲醇、乙酸乙酯和正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)对磺胺类抗生素的提取效果,结果发现三种提取溶剂中甲醇回收率最低,正己烷/乙酸乙酯(1:1, v/v)提取回收率最高,磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的回收率达到79.5%~96.4%。

[0118] 3. 回收率与精密度:以统一血液样品做基质,分别添加低(5 $\mu\text{g/L}$ )、中(20 $\mu\text{g/L}$ )、高(100 $\mu\text{g/L}$ )3个不同浓度的目标物,每个浓度设置3个平行样,检测结果扣除基质样品的测定值。血液样品中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的平均加标回收率为69.5%~

96.4%。见表3；

[0119] 表3:结果扣除基质样品的测定值

Compo unds	Spiked Level						LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )
	5 $\mu\text{g/L}$		20 $\mu\text{g/L}$		100 $\mu\text{g/L}$		
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
[0120] 磷酸二乙酯	69.2	6.01	67.1	5.09	72.8	2.54	0.367
磷酸二正丁酯	76.4	5.28	91.3	4.00	87.5	1.98	0.057
磷酸二苯酯	88.0	3.67	81.5	2.96	96.4	3.37	0.433

[0121] 4、对10个血液样品中3种目标化合物的检测分析结果见表4；

[0122] 表4:10个血液样品中3种目标化合物的检测分析结果

化合物	平均值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	中值 ( $\mu\text{g/kg}$ )	范围( $\mu\text{g/kg}$ )	检出率 (%)
[0123] 磷酸二乙酯	0	0	ND <sup>a</sup>	0
磷酸二正丁酯	0.44	0.53	0.29-1.06	60
磷酸二苯酯	0.69	0.69	0.24-1.11	70

[0124] a:ND低于定量限

[0125] 结论:本发明建立的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)同时测定血液中磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的分析方法。本发明的方法检出限低,稳定性好,检测灵敏度高,用于血液中磷酸酯类污染物的测定,基本能够满足磷酸二乙酯、磷酸二正丁酯和磷酸二苯酯的检测要求。

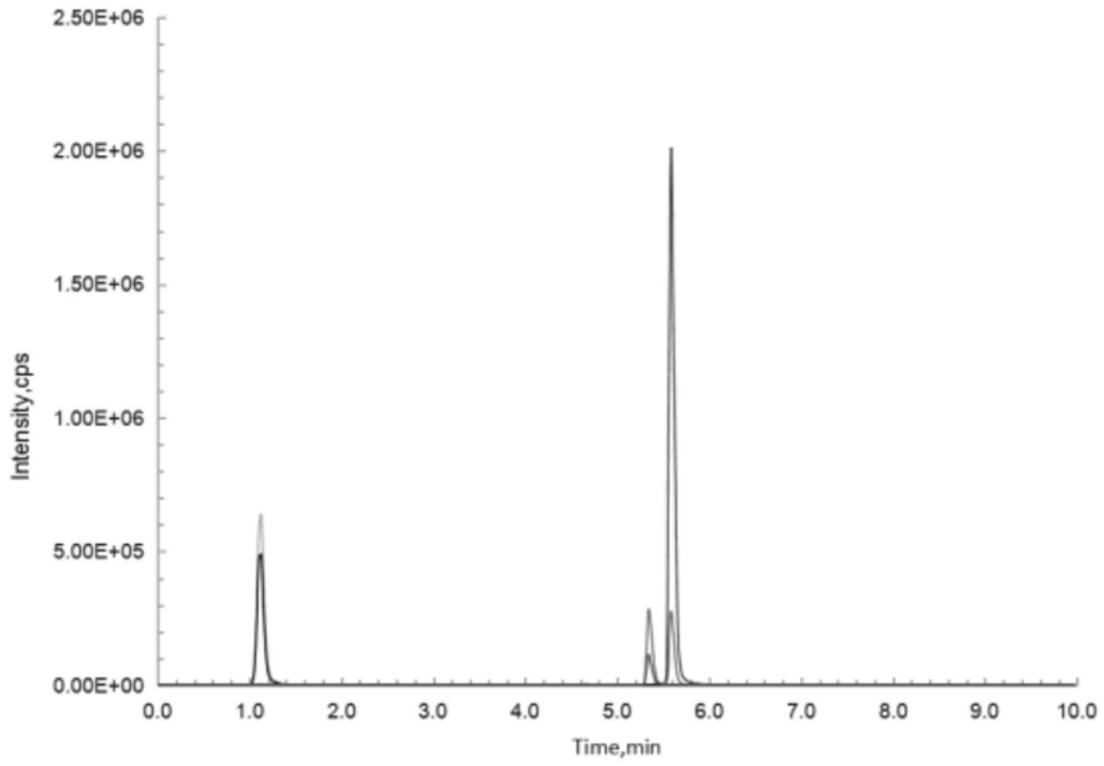


图1