

低共熔溶剂双水相萃取-UPLC法检测 吸烟者尿液中杂环胺类化合物

李敏¹, 贺姗姗¹, 王宏宇¹, 庄家莹¹, 金永日², 李绪文²

(1. 郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 郑州 450001;

2. 吉林大学化学学院, 长春 130012)

摘要 为评估香烟烟气中杂环胺的暴露水平, 建立了一种基于低共熔溶剂/无机盐双水相萃取-UPLC法测定吸烟者尿液中5种杂环胺(IQ, IQ[4,5-b], Harman, Norharman和Phe-P-1)的方法. 制备了7种以氯化胆碱(ChCl)为氢键受体的低共熔溶剂, 并对其进行了表征; 系统考察了影响萃取效率的主要参数, 并将该方法与其它方法进行了对比研究. 结果表明, 在最佳提取条件下, 杂环胺(HAAs)的回收率为81.9%~106.2%, 日内和日间精密密度分别低于2.9%和3.2%, 检出限和定量限分别为0.020~0.097 ng/g和0.19~0.39 ng/g. 该方法具有操作简单、环境友好及单样品成本低等特点, 为尿液中杂环胺的检测提供了一种新方法, 在生物样品检测领域具有良好的开发与应用价值.

关键词 杂环胺; 低共熔溶剂; 双水相萃取; 尿液

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20230469

Aqueous Two-phase Extraction Based on Deep Eutectic Solvents Coupled with UPLC for the Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines in Urine of Smokers

LI Min¹, HE Shanshan¹, WANG Hongyu¹, ZHUANG Jiaying¹, JIN Yongri², LI Xuwen^{2*}

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. College of Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract To assess the exposure to heterocyclic aromatic amines (HAAs) from tobacco smoke, a novel method, an aqueous two-phase system based on deep eutectic solvent (DES-ATPS) followed by UPLC, was described to analyze five HAAs (IQ, IQ [4, 5-b], Harman, Norharman, Phe-P-1) from the urine samples of smokers. Seven kinds of choline chloride (ChCl)-based DESs had been synthesized and characterized by ¹H NMR and FTIR spectra. The significant parameters affecting the extraction efficiency of HAAs in the DES-ATPS procedure were systematically investigated. Under optimal extraction conditions, the recoveries for the target HAAs ranged from 81.9% to 106.2%. The obtained intra- and inter-day relative standard deviations (RSDs) were less than 2.9% and 3.2%, respectively. The detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) were obtained in ranges of 0.020—0.097 ng/g and 0.19—0.39 ng/g, respectively. The developed method of DES-ATPS, with its simplicity, good environment-friendliness and low-cost per sample, could be a promising alternative technique for rapidly extracting and quantifying HAAs from urine samples, and displayed great development potential in the field of the detection in biological samples.

收稿日期: 2023-11-10. 网络首发日期: 2024-01-13.

联系人简介: 李绪文, 男, 博士, 教授, 主要从事药物分析方面的研究. E-mail: xwli@jlu.edu.cn

基金项目: 河南省科技攻关项目(批准号: 222102310463)和郑州轻工业大学博士科研基金(批准号: 13501050065)资助.

Supported by the the Key Scientific and Technological Project of Henan Province, China(No.222102310463), and the Doctoral Scientific Research Foundation of Zhengzhou University of Light Industry, China(No.13501050065).

Keywords Heterocyclic aromatic amine; Deep eutectic solvent; Aqueous two-phase extraction; Urine

杂环胺(HAAs)是蛋白质或氨基酸在加热过程中产生的热解产物,具有潜在的致癌致突变性,目前已经发现并鉴定出超过30种HAAs,可在经热处理的富含蛋白质的食物^[1,2]、咖啡^[3]、环境水^[4]及香烟烟气^[5,6]中检测到.香烟烟气是使人类暴露于HAAs的一种重要途径,受到了广泛关注.1962年, Poindexter和Carpenter^[7]首次在香烟烟气中检出2种HAAs: β -咔啉和咔啉.1997年, Hoffmann^[8]发现 Harman, Norharman, A α C和MeA α C等8种杂环胺为香烟主流烟气中的主要有害物质. A α C是香烟烟雾中含量最多的HAAs,其含量为25~260 ng/支^[9].香烟烟气中HAAs含量虽低,但具有显著的生物毒性,长期暴露于这些HAAs中会对人体构成潜在的健康威胁.因此,有必要开发一种灵敏、快速的评估和监测HAAs暴露水平的方法.

评估和监测HAAs的暴露水平主要是通过检测尿液、血浆、胆汁、毛发和乳汁等生物样品中的HAAs及其代谢产物的含量.相比之下,尿液样品采集方便、无侵害性,常作为HAAs暴露水平监测的有效生物样品^[5].杂环胺的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法和液相色谱-质谱联用(LC-MS)法.由于尿液中的基质干扰和HAAs含量极低(通常为ng/g),为准确测定其含量,在进行HPLC或LC-MS分析之前,需要进行适当的样品预处理.目前,尿液中杂环胺分析常用的样品前处理方法为液-液萃取(LLE)串联固相萃取(SPE)法. Fu等^[5]建立了一种LLE-SPE法结合UHPLC-MS/MS测定吸烟者尿液中HAAs的方法,首先使用乙酸乙酯提取HAAs,然后使用ProElutPXC(150 mg)固相萃取柱纯化.但LLE-SPE方法繁琐、耗时且需使用较多的有机溶剂.基于此, Zhang等^[10]建立了一种磁性固相萃取(MSPE)方法用于分析吸烟者尿液中的HAAs,但该方法仍需使用有机溶剂(乙腈)洗脱目标HAAs且磁性吸附剂的制备过程繁琐且耗时.因此,开发简单、快速且环保的样品前处理方法对于尿液中HAAs的检测分析具有重要意义.

双水相体系(ATPS)具有环保、分离时间短及操作简便等特点,被广泛应用于蛋白质、DNA、金属离子和抗生素等多种目标化合物的提取与分离^[11,12].按照其两相物质组成的不同,ATPS体系可分为高聚物-高聚物体系、表面活性剂-表面活性剂体系、高聚物-盐体系和离子液体-盐体系(IL-ATPS)^[13,14]等.与其它ATPS相比,IL-ATPS体系具有相分离快、黏度低、萃取效率高和无乳化现象等特点,引起了研究者的重点关注^[15,16].然而,大多数ILs制备困难、成本高,其潜在生物毒性(如吡啶或咪唑基IL)对环境也有一定影响^[17,18],从而限制了IL-ATPS的进一步发展.

低共熔溶剂(DES)作为一种新兴的绿色溶剂,克服了ILs的缺点,它是由氢键供体(HBD)和氢键受体(通常为季铵盐, HBA)组合而成的二元或三元共晶混合物,其熔点低于单独任一组分的熔点^[19,20].DES被称为类离子液体混合物,具有与ILs相媲美的理化性质,还有制备简单、生物降解性好及成本低等特性,可作为ILs的潜在替代品^[21,22].2014年, Zeng等^[23]首次提出DES-ATPS体系,用于从水溶液中提取牛血清白蛋白.此后,DES-ATPS在蛋白质、DNA、RNA和其它目标化合物^[24-26]的萃取研究中展现出较大的应用潜力,成为近几年研究的热点.

本文制备了7种以氯化胆碱(ChCl)为氢键受体的DES,与无机盐构建成双水相体系,并结合UPLC检测技术,用于分析吸烟者尿液中5种HAAs(IQ, IQ[4,5-b], Harman, Norharman和Phe-P-1),以期香烟烟气中HAAs暴露风险评估提供新的研究思路.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

2-氨基-3-甲基-咪唑并[4,5-f]-喹啉(IQ, 纯度>98%)、2-氨基-1-甲基-咪唑并[4,5-b]-喹啉(IQ[4,5-b], 纯度>98%)、1-甲基-9H-吡啶并[3,4-b]吡啶(Harman, 纯度>98%)、9H-吡啶并[3,4-b]吡啶(Norharman, 纯度>98%)和2-氨基-5-苯基吡啶(Phe-P-1, 纯度>95%),加拿大Toronto Research Chemicals公司;甲醇和乙腈,色谱纯,美国Thermo Fisher Scientific公司;乙酸和乙酸铵,色谱纯,天津大茂化学试剂厂;氯化胆碱、K₂HPO₄、K₃PO₄、1,4-丁二醇(1,4-Butanediol)、乙二醇(Ethylene glycol)、

甘油(Glycerol)、木糖醇(Xylitol)、*D*-山梨醇(*D*-Sorbitol)、*D*-(+)-葡萄糖[*D*-(+)-Glucose]和*meso*-赤鲜醇(*meso*-Erythritol),分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

吸烟者尿液样本由中国烟草总公司郑州烟草研究院提供,包括20名吸烟者(来自烟龄1~3年的健康成年男性)和20名非吸烟者。在采集样本前,志愿者禁止摄入肉食和烘烤类食物2天,实验期间吸烟者没有吸烟限制。然后,收集志愿者24 h的尿液样品,储存于-80 °C冰箱中备用。

Agilent 1290 Infinity II型超高效液相色谱仪(UPLC),美国Agilent公司;Bruker Avance III 600 M型超导核磁共振波谱仪(¹H NMR, 600 MHz, TMS为内标, DMSO-d₆为溶剂),德国Bruker公司;Vertex 70型傅里叶变换红外光谱仪(溴化钾压片),德国Bruker公司。

1.2 实验过程

1.2.1 UPLC 色谱条件 色谱柱为Agilent ZORBAX XDB C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相由乙腈(A)和水(B,含1 mmol/L乙酸铵和0.05%乙酸)组成,梯度洗脱条件如下:0~5.0 min, 15%A; 5.0~5.1 min, 15%~20%A; 5.1~11.0 min, 20%A; 11.0~11.1 min, 20%~30%A; 11.1~23.0 min, 30%A;柱温为30 °C;流速为1.0 mL/min;检测波长为248 nm;进样量为10 μL。所得UPLC色谱图如图1所示。

1.2.2 DES的制备 以氯化胆碱(ChCl)为HBA,分别与1,4-丁二醇、乙二醇、甘油、木糖醇、*D*-山梨醇、*D*-(+)-葡萄糖和*meso*-赤鲜醇按摩尔比1:1混合于100 mL烧杯中,于130 °C加热搅拌,直至形成无色透明的溶液。冷却至室温后,置于干燥器(硅胶)中保存,备用。7种DES的组成见表1。

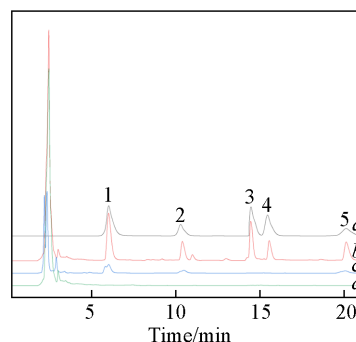


Fig. 1 UPLC chromatograms of the mixed standard solution(a), the spiked urine sample extracted with DES-APTS(b), the spiked urine sample extracted without DES-APTS(c) and the blank urine sample(d)

Peak 1: IQ; peak 2: IQ[4,5-b]; peak 3: Harman; peak 4: Norharman; peak 5: Phe-P-1.

Table 1 Compositions of the synthesized DES using ChCl as HBA

HBD	Abbreviation	Molar ratio	HBD	Abbreviation	Molar ratio
1,4-Butanediol	ChCl/Buta	1:1	Xylitol	ChCl/Xyl	1:1
Ethylene glycol	ChCl/EG	1:1	<i>D</i> -(+)-Glucose	ChCl/Glu	1:1
Glycerol	ChCl/G	1:1	<i>D</i> -Sorbitol	ChCl/Sor	1:1
<i>meso</i> -Erythritol	ChCl/Ery	1:1			

1.2.3 双水相体系相图的绘制 使用浊点滴定法绘制相图^[27]。准确称量一定质量的DES于10 mL离心管中,将已知浓度的无机盐溶液逐滴加入到该离心管中直到混合溶液变浑浊,记录此时加入的无机盐溶液的质量;随后滴加蒸馏水使之变澄清,记录此时加入水的质量;然后再逐滴加入已知浓度的无机盐溶液,使之再次变混浊,再次记录此时加入的无机盐溶液的质量;反复进行上述操作,直至获取足够多的数据来绘制相图,*x*和*y*轴分别代表无机盐和DES的质量分数。

1.2.4 双水相萃取 将尿液样本在室温下自然解冻,取1 mL尿液样本与90 μL 12 mol/L HCl混合,于70 °C下加热3 h。冷却至室温后,用10 mol/L NaOH溶液将尿液的pH值调至中性;然后向尿液中加入混合标准溶液并涡旋振荡30 s使其混合均匀;随后加入200 mg ChCl/Buta和0.8 g K₂HPO₄,涡旋振荡3 min,在8000 r/min转速下离心3 min。从离心机取出后尿液样本上下界面清晰,用微量注射器移取上层富DES相并记录其体积,经0.22 μm滤膜过滤,待UPLC检测。

2 结果与讨论

2.1 DES结构表征

傅里叶变换红外光谱(FTIR)可以用于检测化合物的化学键和官能团,从而掌握其结构信息。ChCl

和7种DES的FTIR谱图如图2所示. 650.4和1050.2 cm^{-1} 处的吸收峰可分别归属为O—H键的弯曲振动和醇或糖的C—O键(C—O—H)的伸缩振动. 7种DES在3400 cm^{-1} 附近均有显著宽峰, 表明存在大量的氢键. 与ChCl(3421.1 cm^{-1})相比, ChCl/EG, ChCl/G, ChCl/Sor, ChCl/Buta, ChCl/Glu, ChCl/Xyl和ChCl/Ery中O—H键的伸缩振动峰向低波数方向发生了移动^[28](3398.0, 3394.1, 3390.2, 3388.3, 3380.6, 3394.1和3384.5 cm^{-1}), 进一步证实了氢键的存在.

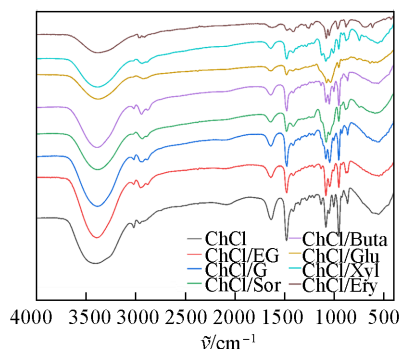


Fig. 2 FTIR spectra of ChCl and seven DES

为了进一步验证DES的结构, 测定了以DMSO- d_6 为溶剂的7种DES的 ^1H NMR谱图. 图3中 δ 3.17 (s, 9H), 3.46(t, 2H)和3.82(t, 2H)处均为ChCl的质子信号, 其余各信号均归属于相应氢键供体的质子信号, 并未出现其它新化学键的质子信号, 说明制备过程中未发生化学反应^[29], 进一步说明氯化胆碱与氢键供体之间的作用力为氢键.

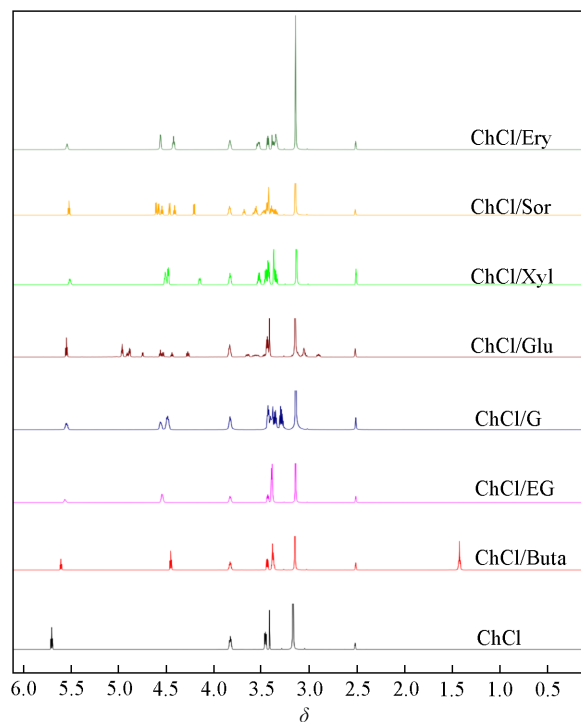


Fig. 3 ^1H NMR spectra of ChCl and seven DES

2.2 DES-ATPS相图及成相规律

双水相相图的每一条双结线均由众多成相临界点构成. 位于双结线之上的区域代表该浓度下的盐和低共熔溶剂具有成相能力, 为双水相体系; 双结线之下的区域则是均一液体, 无成相能力, 为单相体系. 成相能力越强, 双结线越接近坐标原点^[30]. 由图4可知, 当无机盐为 K_2HPO_4 时, 其与7种DES的成相能力依次为ChCl/Buta>ChCl/EG>ChCl/G>ChCl/Glu>ChCl/Sor \approx ChCl/Ery>ChCl/Xyl. 由此可见, DES种类不同, 形成双水相的能力不同, 分析其原因可能与DES的亲水性、黏度和密度等多种因素有关^[24,31]. 其中, 亲水性是影响相形成能力的主要因素之一, 通常情况下氢键供体中羟基含量越少, 亲水性越弱, 越有利于成相. 7种氢键供体[1,4-丁二醇、乙二醇、甘油、*meso*-赤鲜醇、木糖醇、*D*-(+)-葡萄糖和*D*-山梨醇]含有的羟基数目分别为2, 2, 3, 4, 5, 5和6, ChCl/Buta, ChCl/EG, ChCl/G, ChCl/Glu, ChCl/Sor与 K_2HPO_4 的成相能力符合上述规律, 而ChCl/Ery和ChCl/Xyl则不符合, 推测ChCl/Ery和ChCl/Xyl的成相能力还与DES的黏度和密度有关, 进一步证明了导致成相能力差异的原因是多种因素共同作用的

结果.

进一步比较了不同无机盐(K_2HPO_4 和 K_3PO_4)对ChCl/Buta相图形成能力的影响. 由图4可知, ChCl/Buta- K_2HPO_4 的成相能力强于ChCl/Buta- K_3PO_4 .

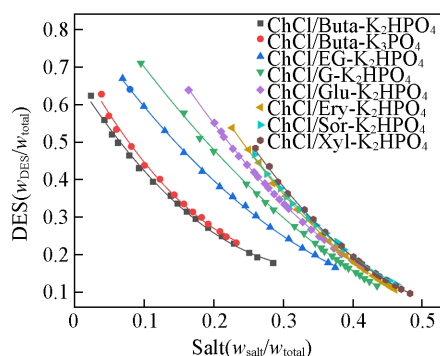


Fig. 4 Phase diagrams of DES-based ATPS

W_{salt} , W_{water} and W_{DES} represent the weight of inorganic salt, water and DES, respectively; W_{total} is the sum of W_{salt} , W_{water} , and W_{DES} .

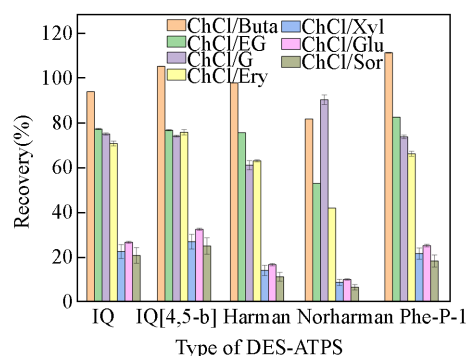


Fig. 5 Effect of the type of DES on recovery

2.3 DES-ATPS 萃取条件的优化

2.3.1 DES类型的选择 制备了以ChCl为氢键受体的7种DES, 虽然氢键受体相同, 但由于氢键供体的极性、亲水性等性质的不同, 制备得到的DES性质也不同, 影响了萃取溶剂与目标物之间的相互作用, 进而影响萃取率^[32]. 考察了7种不同DES对尿液中杂环胺回收率的影响, 平行测定3次. 如图5所示, 当使用ChCl/Xyl, ChCl/Glu和ChCl/Sor为萃取剂时, 杂环胺的回收率均低于40%, 其原因可能是氢键供体[木糖醇、D-(+)-葡萄糖、D-山梨醇]含有一OH的数量较多, 形成的DES(ChCl/Xyl, ChCl/Glu和ChCl/Sor)黏度较大, 阻碍了ChCl/ATPS体系与杂环胺目标分子之间的相互作用, 故而出现较低的回收率. 相比之下, ChCl/Buta体系表现出较好的杂环胺回收率, 且结合双水相相图的分相能力, 实验选择DES类型为ChCl/Buta.

2.3.2 DES用量的选择 DES的用量直接影响到萃取效率, 是能否将目标分析物提取完全的关键性因素. 考察了不同DES使用量(50~350 mg)对杂环胺回收率的影响, 平行测定3次, 结果如图6所示. 结果表明, 随着DES使用量的不断增加, 回收率也不断升高, 当DES使用量增加到200 mg时, 回收率达到最大值; 再继续增大DES的使用量, 回收率略有下降, 这可能是随着DES使用量的进一步增加, DES相的黏度也会增加, 不利于HAA向DES相转移, 从而导致回收率的轻微下降. 因此, 实验选择ChCl/Buta使用量为200 mg.

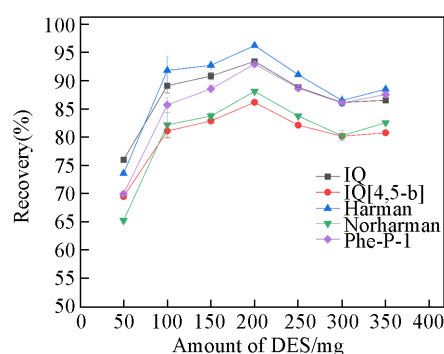


Fig. 6 Effect of the amount of DES on recovery

Spiked concentration in 1 mL urine sample: IQ, 1.5 $\mu\text{g/mL}$; IQ[4,5-b], 3.0 $\mu\text{g/mL}$; Harman, 1.5 $\mu\text{g/mL}$; Norharman, 1.5 $\mu\text{g/mL}$; Phe-P-1, 3.0 $\mu\text{g/mL}$.

2.3.3 无机盐类型的选择 无机盐的加入能够促进双水相的形成, 不同种类的盐与DES的成相能力不同, 进而影响目标分析物的提取效率^[33]. 首先, 考察了4种含钾无机盐(K_2HPO_4 , KCl, K_3PO_4 和 KH_2PO_4)与ChCl/Buta的成相能力. 实验中发现, KH_2PO_4 和KCl与ChCl/Buta均不能形成双水相体系, 可能是因为 KH_2PO_4 和KCl的水溶性较低. 然后, 重点考察了ChCl/Buta- K_2HPO_4 和ChCl/Buta- K_3PO_4 两种双水相体系对杂环胺回收率的影响, 平行测定3次, 结果如图7所示. 结果表明, ChCl/Buta- K_2HPO_4 双水相体系中杂环胺回收率稍高于ChCl/Buta- K_3PO_4 体系. 另外, 结合相图可知 K_2HPO_4 比 K_3PO_4 具有更强的成相能力, 且得到体积相同的DES相时, K_2HPO_4 的用量少于 K_3PO_4 . 综合考虑, 实验选择 K_2HPO_4 作为

双水相的无机盐。

2.3.4 无机盐使用量的选择 无机盐的用量决定着是否能形成双水相体系, 同时也会降低目标物在水相的溶解度, 促使更多的目标物转移到 DES 相, 进而影响萃取效率^[34]。考察了不同 K_2HPO_4 的使用量 (0.2~1.4 g) 对杂环胺回收率的影响, 平行测定 3 次。如图 8 所示, 当 K_2HPO_4 加入量增加至 0.4 g 时, 还不能形成 DES-ATPS 双水相体系。当加入量为 0.6 g 时, 开始形成双水相体系, 呈现清晰的两相, 此时杂环胺回收率急剧增加。当 K_2HPO_4 达到 0.8 g 时, 杂环胺回收率达到最大值。当 K_2HPO_4 使用量继续增加至 1.2 g, 杂环胺回收率趋于平稳, 可能是因为 DES 相中 DES 含量趋于饱和, 萃取效率增加缓慢; 当 K_2HPO_4 用量大于 1.2 g 时, 可能是因为溶液体系黏度的增加不利于 HAAs 向 DES 相扩散, 导致萃取效率略有下降。因此, 实验选择无机盐用量为 0.8 g。

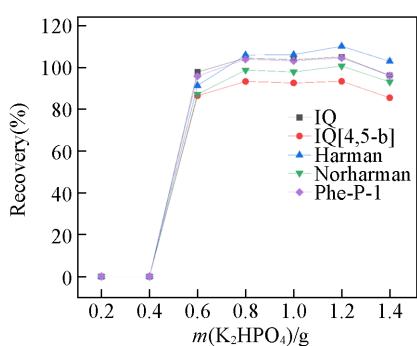


Fig. 8 Effect of the amount of K_2HPO_4 on recovery

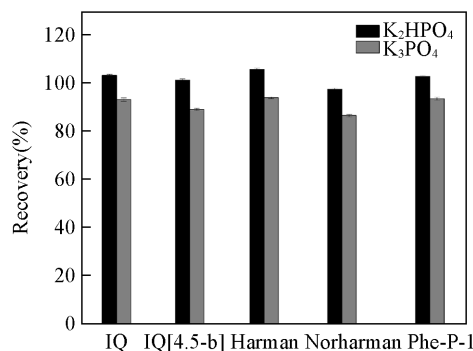


Fig. 7 Effect of the type of inorganic salt on recovery

Spiked concentration in 1 mL urine sample: IQ, 1.5 $\mu\text{g/mL}$; IQ[4, 5-b], 3.0 $\mu\text{g/mL}$; Harman, 1.5 $\mu\text{g/mL}$; Norharman, 1.5 $\mu\text{g/mL}$; Phe-P-1, 3.0 $\mu\text{g/mL}$.

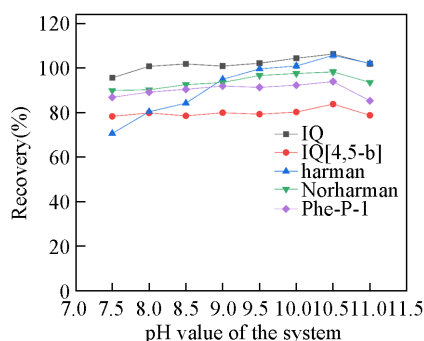


Fig. 9 Effect of pH value of sample solution on recovery

2.3.5 pH 值的选择 由于 HAAs 是两性物质, 体系的 pH 值影响着溶液中 HAAs 的存在状态, 进而影响其萃取效率^[35]。实验中通过在尿液样品中加入适量的氨水来调节体系的 pH 值, 考察了体系 pH 值从 7.5 到 11.5 对杂环胺回收率的影响, 平行测定 3 次, 结果如图 9 所示。结果表明, 当体系的 pH=10.5 时, 杂环胺的回收率最高, 这可能是因为此时杂环胺以游离碱形式存在于样品溶液中, 更容易被萃取到 DES 相中。因此, 实验选择体系 pH 值为 10.5。

2.3.6 萃取时间的选择 采用涡旋振荡辅助的方式提取目标物, 涡旋振荡能够促进 DES 与样品溶液充分接触, 促进目标物向 DES 相转移, 进而提高杂环胺的萃取效率。涡旋萃取时间太短会导致杂环胺提取不完全, 时间过长又会增加时间成本^[36]。考察了不同萃取时间 (1~11 min) 对杂环胺回收率的影响, 平行测定 3 次。如图 10 所示, 当萃取时间从 1 min 增加到 3 min 时, 杂环胺回收率略有增加, 继续增加萃取时间, 回收率变化不大。因此, 实验选择萃取时间为 3 min。

2.3.7 离心时间的选择 离心可以促进 DES 相与水相之间形成清晰稳定的界面, 实验考察了不同离心时间 (1~11 min) 对界面清晰度的影响, 平行测定 3 次。结果表明, 当离心时间为 3 min 时, 上下两相界面即能达到清晰。

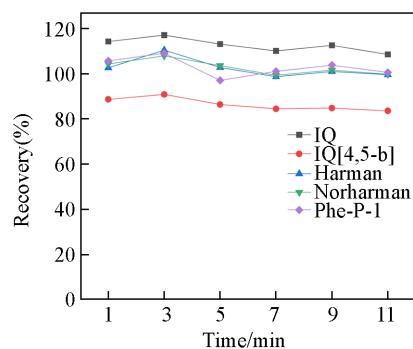


Fig. 10 Effect of vortex time on recovery

2.4 方法学考察

通过测定线性、检出限(LODs)、定量限(LOQs)、准确度和精密度,评估了所建立方法的分析性能,结果列于表2. 以待测样品中杂环胺的浓度为横坐标(x),相应的峰面积为纵坐标(y)绘制工作曲线,其相关系数(R^2)均大于0.999,表明该方法线性关系良好. 分别用3倍和10倍信噪比(S/N)确定方法的检出限(LODs)和定量限(LOQs),分别为0.020~0.097 ng/g和0.19~0.39 ng/g.

Table 2 Analytical performances of the method

Analyte	Linear range/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	R^2	Recovery \pm RSD(%), $n=6$			Inter-Day RSD(%)	LOQs/($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)	LODs/($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)
			Low	Middle	High			
IQ	1.02—204.0	0.9997	98.4 \pm 1.8	106.2 \pm 2.5	96.6 \pm 1.4	1.8	0.19	0.020
IQ[4,5-b]	2.50—500.0	0.9990	81.9 \pm 2.2	82.5 \pm 0.9	84.0 \pm 2.8	1.0	0.34	0.097
Harman	1.00—200.0	0.9998	97.8 \pm 2.9	103.6 \pm 2.1	99.5 \pm 1.8	1.4	0.27	0.032
Norharman	1.02—204.0	0.9995	100.6 \pm 2.7	94.3 \pm 2.1	95.9 \pm 1.3	3.2	0.21	0.038
Phe-P-1	2.55—510.0	0.9989	90.8 \pm 1.6	101.5 \pm 2.6	90.9 \pm 1.8	2.4	0.39	0.085

通过日内和日间重复性实验考察了方法的精密度,5种杂环胺的日内和日间相对标准偏差(RSD)分别低于2.9%和3.2%,表明该方法具有较好的精密度和稳定性.

通过加标回收率考察了方法的准确性,结果表明,在低、中、高3个加标水平下杂环胺的回收率分别为81.9%~100.6%,82.5%~106.2%和84.0%~99.5%,均处于70%~120%之间,表明该方法准确性良好.

2.5 方法对比

将本文方法的加样回收率、检出限、精密度和有机溶剂消耗量等参数与文献报道的其它方法进行了比较,结果列于表3. 结果表明,LLE-SPE串联法和两步固相萃取串联法需使用大量的有机溶剂,预处理过程繁琐且耗时,而本文方法不使用有机溶剂、操作简单且前处理时间短;磁性固相萃取法中磁性材料的制备步骤繁琐、操作麻烦、耗时长,本文方法中DES合成简单,成本低廉且更绿色环保.

此外,表3数据还表明,DES-APTS方法具有更好或相当的准确度和精密度,检出限高于LC-MS测定的检出限,但在可接受的范围内,符合相关标准;与LC-MS相比,HPLC仪器更易实现普及. 以上结果验证本文方法具有快速、简便、单样品成本低及不使用有机溶剂等特点,适用于尿液样品中HAAs分析.

Table 3 Comparison of the present method with other methods

Extraction Method	Detection method	Matrix	Recovery(%)	RSD(%)	LODs	Organic reagent/mL	Ref.
LLE ^a tandem SPE ^b	UHPLC-MS/MS	Urine	71.2—124	\leq 10	0.80—6.06 pg/mL	>20	[5]
Two-step SPE	HPLC-MS/MS	Urine	44—93	\leq 10	0.31—0.83 pg/mL	>8.25	[6]
MSPE ^c	UPLC-MS/MS	Urine	95.4—129.3	<7.3	0.14—0.46 pg/mL	>2	[10]
Tandem solvent/ SPE	UPLC/MS	Urine	—	—	2.5 pg/mL	>8	[37]
DES-APTS	UPLC-DAD	Urine	81.9—106.2	<3.2	0.020—0.097 ng/g	0	This study

a. Liquid-liquid extraction; b. solid-phase extraction; c. magnetic solid-phase extraction.

2.6 实际样品分析

利用本文方法对20份非吸烟者和20份吸烟者尿液样本进行了分析,结果表明,仅在其中2份吸烟者尿液中检测出Harman,但均低于定量限.

3 结 论

建立了一种低共熔溶剂/无机盐双水相萃取(DES-APTS)结合超高效液相色谱法测定吸烟者和非吸烟者尿液中5种杂环胺含量的方法. 首先,以氯化胆碱为氢键受体,与不同的氢键供体制备7种不同的DES,利用FTIR和¹H NMR对其结构进行了表征,并讨论了不同的氢键供体对成相能力的影响规律;其

次,通过单因素实验确定了DES-APTS体系的最优萃取条件,并评价了其分析性能.结果表明,本文方法具有良好的线性、准确性和重现性.与文献报道的方法相比,本文方法具有环境友好、操作简单、快速及单样品成本低等特性,为评估香烟烟气中杂环胺的暴露水平提供一种有效方法,为卷烟危害性评价提供新的研究思路,同时拓宽了DES-ATPS体系的应用领域.此外,低共熔溶剂合成简单,成本低廉且更绿色环保,可作为离子液体的潜在替代品,在样品前处理领域具有良好的发展前景和应用潜力.

参 考 文 献

- [1] Feng Y. M., Xu Y., Li W. R., Chen S. S., Su Z. Q., Xi L. Y., Li G. L., *Food Control*, **2022**, *137*, 108929
- [2] Li M., Wang P. X., Zhang X., Wang H. Y., Li K., Bai Y. H., *Foods*, **2022**, *12*, 138
- [3] Chiang C. F., Liao P. Lin., Hsu K. C., Shen J. Y., Lin J. T., Yang D. J., *Food Chem.*, **2022**, *380*, 132184
- [4] Miller-Schulze J. P., Porto R. D., Fagundes A., Pham K. O., Olson M., Schauer J. J., *Anal. Lett.*, **2022**, *55*, 2436—2449
- [5] Fu Y., Zhao G., Wang S., Yu J. J., Xie F. W., Wang H., Xie J. P., *J. Chromatogr. A*, **2014**, *1333*, 45—53
- [6] Zhang L., Xia Y., Xia B. Y., Nicodemus K. J., McGuffey J., McGahee E., Blount B., Wang L. Q., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408*, 8149—8161
- [7] Poindexter E. H., Carpenter R. D. T., *Phytochemistry*, **1962**, *1*, 215—221
- [8] Hoffmann D., Hoffmann I., *J. Toxicol. Environ. Health*, **1997**, *50*, 307—364
- [9] Konorev D., Koopmeiners J. S., Tang Y. J., Thompson E. A. F., Jensen J. A., Hatsukami D. K., Turesky R. J., *Chem. Res. Toxicol.*, **2015**, *28*, 2390—2399
- [10] Zhang W. F., Lan C., Zhang H. M., Zhang Y. H., Zhang W. J., Zhao W. D., Johnson C., Hu K., Xie F. W., Zhang S. S., *J. Agric. Food Chem.*, **2019**, *67*, 3733—3743
- [11] Gu Y. X., Cao J., Ye L. H., *Ind. Crop. Prod.*, **2022**, *188*, 115708
- [12] Martinez M., Barrueto Y., Jimenez Y. P., *Hydrometallurgy*, **2023**, *219*, 106077
- [13] Gao C., Cai C. Y., Liu J. J., Wang Y. N., Chen Y. Z., Wang L. Q., Tan Z. J., *Food Chem.*, **2020**, *313*, 126164
- [14] Sun D. Y., Wang R. P., Li F. F., Liu L. L., Tan Z. J., *Processes*, **2018**, *6*, 212
- [15] Zhang Q., Sang Z. L., Li Q. P., Gong J. K., Shi R., Zhang B. L., Zhang Z. B., Li S. J., Yang X. J., *Hydrometallurgy*, **2023**, *216*, 106017
- [16] Yao T., Yao S., *J. Chromatogr. A*, **2017**, *1481*, 12—22
- [17] Zafarani-Moattar M. T., Shekaari H., Fattah S. G., Mokhtarpour M., *J. Mol. Liq.*, **2022**, *360*, 119475
- [18] Xu K. J., Wang Y. Z., Huang Y. H., Li N., Wen Q., *Anal. Chim. Acta*, **2015**, *864*, 9—20
- [19] Rashid R., Wani S. M., Manzoor S., Masoodi F. A., Dar M. M., *Food Chem.*, **2023**, *398*, 133871
- [20] Jamali M. R., Nakhaei J. M., Sohrabnezhad S., Rahnama R., *J. Anal. Chem.*, **2023**, *78*, 980—987
- [21] Nam N. N., Do H. D. K., Trinh K. T. L., Lee N. Y., *Nanomaterials*, **2023**, *13*, 1164
- [22] Wang T., Xu W. J., Wang S. X., Kou P., Wang P., Wang X. Q., Fu Y. J., *Food Bioprod. Process*, **2017**, *105*, 205—214
- [23] Zeng Q., Wang Y. Z., Huang Y. H., Ding X. Q., Chen J., Xu K. J., *Analyst*, **2014**, *139*, 2565—2673
- [24] Li N., Wang Y. Z., Xu K. J., Huang Y. H., Wen Q., Ding X. Q., *Talanta*, **2016**, *152*, 23—32
- [25] Deng W. W., Zong Y., Xiao Y. X., *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **2017**, *5*, 4267—4275
- [26] Jia L. Y., Huang X., Zhao W. F., Wang H. H., Jing X., *Food Chem.*, **2020**, *317*, 126424
- [27] Zhao R. T., Pei D., Yu P. L., Wei J. T., Wang N. L., Di D. L., Liu Y. W., *J. Sep. Sci.*, **2022**, *43*, 348—359
- [28] Deng W. W., Yu L., Li X., Chen J., Wang X. X., Deng Z. X., Xiao Y. X., *Food Chem.*, **2019**, *274*, 891—899
- [29] Li P., Zhao P. Y., Liu W. J., Jiang Y. F., Wang W. J., Bao L. Y., Jin Y. R., Li X. W., *Microchem J.*, **2018**, *137*, 302—308
- [30] Deng W. W., Zong Y., Xiao Y. X., *ACS Sustainable Chem. Eng.*, **2017**, *5*, 4267—4275
- [31] Han X., Li W. N., Ma X. X., Fan D. D., *J. Biosci. Bioeng.*, **2020**, *130*, 390—396
- [32] Farias F. O., Passos H., Coutinho J. A. P., Mafra M. R., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **2018**, *57*, 16917—16924
- [33] Shao M. Y., Zhang X. L., Li N., Shi J. Y., Zhang H. J., Wang Z. B., Zhang H. Q., Yu A. M., Yu Y., *J. Chromatogr. B*, **2014**, *961*, 5—12
- [34] Wang Q. F., Wei N. N., Wang Y. F., Hou Y. H., Ren X. L., Wei Q. F., *J. Appl. Phycol.*, **2020**, *32*, 3873—3883
- [35] Yue X. Y., Fu L., Zhou J. W., Li Y., Li M., Wang Y. W., Bai Y. H., *Food Chem.*, **2024**, *432*, 137213
- [36] Wang X. Z., Li X. W., Li L. J., Li M., Wu Q., Liu Y., Yang J., Jin Y. R., *Anal. Methods*, **2016**, *8*, 6566—6572
- [37] Konorev D., Koopmeiners J. S., Tang J., Thompson E. A. F., Jensen J. A., Hatsukami D. K., Turesky R. J., *Chem. Res. Toxicol.*, **2015**, *28*, 2390—2399

(Ed.: N, K)