

# 吐温 20 增敏同步荧光光谱法测定尿液中 1-羟基芘

张悦 马睿 范世华\*

(东北大学理学院分析科学研究中心, 沈阳 110004)

**摘要** 尿液中 1-羟基芘作为人体内多环芳烃 (PAHs) 的代谢产物, 是高浓度 PAHs 职业环境和一般环境中人体接触 PAHs 的一个灵敏指标, 已被广泛用于评价人体和动物与多环芳烃接触的内暴露生物指示物, 其含量的测定具有重要的意义。本研究建立了人尿中 1-羟基芘 (1-OHP) 的同步荧光测定方法。在 Britton Robinson 缓冲溶液 (pH 2.6) 中, 以同步波长差  $\Delta\lambda = 34 \text{ nm}$  进行同步荧光扫描, 其同步特征峰的强度与 1-OHP 的浓度呈线性关系。表面活性剂吐温 20 对 1-OHP 的同步荧光具有增敏作用。本方法的线性范围为  $2.5 \times 10^{-10} \sim 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ; 检出限为  $9.5 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ ; 相对标准偏差 (RSD) 为 0.78% ( $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ,  $n = 11$ )。应用于实际尿样的测定, 加标回收率为 93.8% ~ 107.4%。

**关键词** 1-羟基芘; 同步荧光; 尿样; 吐温 20

## 1 引言

多环芳烃 (PAHs) 化合物是与人类密切相关、数量最多、分布最广的一类环境致癌物质。其生物有效性部分可通过食物链的富集、迁移, 最终影响人类的健康, 其强烈的致癌、致畸、致突变作用引起了广泛关注, 被列为环境优先监测污染物<sup>[1]</sup>。1-羟基芘 (1-Hydroxypyrene, 1-OHP) 是多环芳烃中的芘类在人体内产生并由尿液排出体外的主要代谢产物, 是高浓度 PAHs 职业环境和一般环境中人体接触 PAHs 的一个灵敏指标<sup>[2]</sup>。作为人体内 PAHs 的代谢产物, 尿中 1-羟基芘已被广泛用于评价人体和动物与多环芳烃接触的内暴露生物指示物<sup>[3]</sup>, 其含量测定具有重要意义。

目前, 测定生物样品中 1-OHP 主要方法是高效液相色谱法<sup>[4-7]</sup>。近年来, 气相色谱-质谱 (GC-MS) 或液相色谱-质谱 (LC-MS) 联用技术用于 1-OHP 测定也有报道<sup>[8]</sup>; Campo 等<sup>[9]</sup>采用 GC-MS 方法测定人体尿液中 12 种多环芳烃的羟基代谢产物, 以正己烷萃取酶解后的尿样, 测定了  $0.1 \sim 1.4 \mu\text{g/L}$  范围的 1-OHP; Mattarozzi 等<sup>[10]</sup>采用酶法水解、顶空固相微萃取、气质联用技术测定了人尿中包括 1-OHP 在内的 5 种多环芳烃代谢产物, 回收率为 98% ~ 121%。液相色谱-串联质谱联用技术测定 1-OHP 的灵敏度更高。这些方法包括液相色谱-大气压化学电离串联质谱法<sup>[11]</sup>和液相色谱电喷雾串联质谱 (LC-ESI-MS) 法<sup>[12]</sup>; Pignini 等<sup>[13]</sup>用固相萃取方法处理酶解后的尿样, 用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC/MS/MS) 方法测定了低至  $0.005 \mu\text{g/L}$  1-OHP; Schiewek 等<sup>[14]</sup>提出了超灵敏的测定 1-OHP 的方法, 以大气压激光电离技术 (APLD) 为 GC-MS 界面, 测定尿中 1-OHP, 检出限达到  $22 \text{ pmol/L}$ 。

1-OHP 是内源荧光物质, 无需衍生可直接进行荧光测定<sup>[6, 15]</sup>。但 1-OHP 的荧光光谱范围宽, 谱图复杂, 若用常规的荧光测定, 由于尿样中基体复杂, 易导致试液中 1-OHP 的峰形失真。当 1-OHP 的浓度很低时, 峰形改变更加严重, 难以进行测定<sup>[16]</sup>。同步荧光分析法具有灵敏度高、操作简便、谱图简单、选择性好、光散射干扰小等特点, 目前已有使用十二烷基苯磺酸钠或  $\beta$ -环糊精为增敏剂, 同步荧光测定 1-OHP 的文献报道<sup>[16-18]</sup>。本实验在对 1-OHP 的荧光光谱特征进行研究的基础上, 以吐温 20 为增敏剂同步荧光测定 1-OHP, 并成功地用于人体尿液中 1-OHP 的测定。

2009-12-09 收稿; 2010-03-03 接受

本文系辽宁省高校重点实验室 (No. 2008S093) 资助项目

\* E-mail: shfnet@sina.com

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

Hitachi F-4500 荧光分光光度计 (日本日立公司); 雷磁 PHSJ-3F pH 计 (上海精密科学仪器有限公司); HH-1 恒温水浴锅 (常州澳华仪器有限公司)。

1-OHP 标准储备溶液: 称取适量 1-OHP (98%, 美国 Aldrich 公司), 用乙醇/水 (1:1, *V/V*) 溶解, 配制成 1.0 mmol/L 的储备液, 在冰箱中 4 °C 保存。使用时用二次去离子水稀释至所需浓度; Britton-Robinson (B-R) 缓冲溶液: 用 0.04 mol/L 磷酸/硼酸/乙酸的混合溶液配制, 使用时用 0.02 mol/L NaOH 调至所需 pH 值。吐温 20 和无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司); 除吐温 20 为化学纯外, 其它试剂均为分析纯, 实验用水为二次去离子水。

### 2.2 实验方法

于 10 mL 棕色容量瓶中依次加入 2.0 mL B-R 缓冲溶液 (pH 2.6), 0.6 mL 无水乙醇, 0.2 mL 5% 吐温 20 溶液, 以及适量 1-OHP 溶液, 用水定容, 摇匀。溶液置于 1 cm 石英液池中, 设置同步波长差  $\Delta\lambda = 34$  nm, 激发波长从 330~380 nm 进行同步荧光扫描, 得到 1-OHP 的同步荧光光谱, 根据特征波长处的相对荧光强度  $\Delta F$  与 1-OHP 相应浓度的关系, 绘制工作曲线。用同样方法测定尿样中 1-OHP 的相对同步荧光强度, 通过工作曲线计算尿样中 1-OHP 的含量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 1-羟基萘的激发和发射光谱

调整光电倍增管电压 700 V, 扫描速度 240 nm/min, 激发和发射狭缝宽度分别为 5 nm。对 1-OHP 进行激发和发射光谱的扫描结果, 如图 1 所示。其发射光谱的最大峰值位于 388 nm, 并在 409 nm 处有一个较弱发射峰; 在 200~400 nm, 1-OHP 有 3 个明显的激发峰, 分别位于 244、279 和 349 nm。可见 1-OHP 的激发和发射光谱均由多个峰组成, 光谱范围较宽, 谱图较为复杂。

### 3.2 同步波长差 $\Delta\lambda$ 的选取

在  $\Delta\lambda = 10 \sim 100$  nm 范围内考察了同步波长差对 1-OHP 同步荧光光谱的影响。结果表明,  $\Delta\lambda \leq 25$  nm 时 1-OHP 同步荧光光谱的相对荧光强度较弱;  $\Delta\lambda = 30 \sim 44$  nm 时, 1-OHP 同步荧光光谱的峰形较好, 相对荧光强度较强;  $\Delta\lambda \geq 45$  nm 时, 随着  $\Delta\lambda$  的增加, 1-OHP 的同步荧光光谱逐渐变宽, 相对荧光信号逐渐减弱。实验最终选取同步波长差  $\Delta\lambda = 34$  nm, 在此实验条件下, 1-OHP 的峰形较窄, 空白值较小, 相对荧光强度大, 其同步荧光光谱如图 2 所示。同步特征峰位于 354 nm, 1-OHP 的同步荧光光谱较其常规的荧光光谱简化许多, 从而使直接测定混合物中的 1-OHP 成为可能。

### 3.3 乙醇浓度的影响

实验表明, 以乙醇为溶剂 1-OHP 的荧光强度高于在同样浓度甲醇中的荧光强度。实验选取乙醇为溶剂, 考察了其含量对 1-OHP 相对荧光强度的影响。在 0%~10% 范围内, 随着乙醇含量的增加, 相对荧光强度逐渐增大。实验最终选取 6% 乙醇水溶液为溶剂, 此时, 1-OHP 的同步荧光信号较强, 试剂空白小。

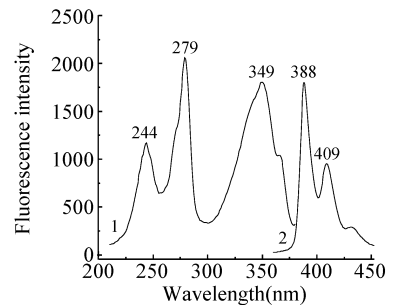


图 1 1-羟基萘的激发和发射光谱

Fig 1 Excitation spectra and emission spectra of 1-hydroxynaphthalene

1 激发光谱 (Excitation spectra); 2 发射光谱 (Emission spectra)。

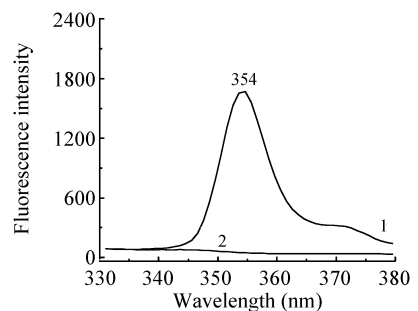


图 2 1-羟基萘和空白溶液的同步荧光光谱 ( $\Delta\lambda = 34$  nm)

Fig 2 Synchronous fluorescence spectra of 1-hydroxynaphthalene and blank ( $\Delta\lambda = 34$  nm)

1 1-羟基萘 (1-Hydroxynaphthalene); 2 空白 (Blank).  $\Delta\lambda = 34$  nm.

### 3.4 缓冲体系及溶液 pH 值的影响

考察了不同缓冲体系对荧光强度的影响。实验发现,在 B-R 缓冲溶液中,1-OHP 的同步荧光的灵敏度高且稳定性好。随着 pH 值的增加,相对荧光强度  $\Delta F$  逐渐降低(图 3)。这可能是由于 1-OHP 羟基上以及芳环的某些位置上的氢原子性质比较活泼,在有  $\text{OH}^-$  存在时,会失去氢原子,致使整个芳环上的电子云密度降低,共轭性下降,荧光值随之降低的缘故<sup>[17]</sup>。在  $\text{pH} = 2.6$  时,1-OHP 的荧光强度达到最大值,故实验选取  $\text{pH} = 2.6$  的 B-R 缓冲溶液为缓冲体系。在 1.0~3.0 mL 范围内,考察了缓冲溶液用量的影响,选取加入量为 2.0 mL。

### 3.5 增敏剂的选择及反应体系的稳定性

分别考察了 Triton X-100 吐温 20 吐温 40 十六烷基三甲基溴化胺 (CTMAB) 以及十二烷基硫酸钠 (SDS) 等表面活性剂对体系的增敏作用;实验表明,CTMAB 和 SDS 对体系具有一定的猝灭作用,而 Triton X-100 吐温 20 吐温 40 对体系均有增敏作用。相对于未加增敏剂的 1-OHP 溶液, Triton X-100 吐温 20 吐温 40 可使 1-OHP 的相对荧光强度分别增加 50%, 60% 和 58%。其中吐温 20 和吐温 40 的增敏效果相近,但吐温 40 使空白信号显著增强,故选取吐温 20 作为体系的增敏剂。吐温 20 对 1-OHP 的同步荧光强度的影响如图 4 所示。实验确定吐温 20 的浓度为 0.2%。

按实验方法配制溶液,静置不同时间测定同步荧光强度,考察溶液的荧光强度随时间的变化情况。实验结果表明,在室温条件下,试剂混合 5 min 后,1-OHP 的相对荧光强度变化很小,并在 80 min 内保持稳定。故实验在试剂混合 5 min 后进行测定。

### 3.6 线性范围、检出限和测定精度

在最佳的实验条件下,按实验方法分别对一系列浓度的 1-OHP 标准溶液进行同步荧光扫描,绘制工作曲线。在  $2.5 \times 10^{-10} \sim 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  范围内,1-OHP 的浓度与相对荧光强度  $\Delta F$  呈线性关系;其线性回归方程为  $\Delta F = 138.7C (\times 10^{-8} \text{ mol/L}) + 23.14$ , 相关系数  $R = 0.9996$  方法的检出限 ( $3\sigma$ ) 为  $9.5 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ 。相对标准偏差为 0.78% ( $n = 11, 1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ )。

### 3.7 共存物质的影响

按实验方法考察了多种共存离子及物质对  $0.2 \mu\text{mol/L}$  1-OHP 测定的影响。相对误差在  $\pm 5\%$  范围内,一些离子或物质的允许倍数分别是:尿素 (30000);  $\text{Cl}^-$  (10000);  $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{NH}_4^+$ 、丙酮、葡萄糖、柠檬酸、草酸、苯丙氨酸、正己烷 (5000);  $\text{Na}^+$  (4000); 色氨酸 (3000);  $\text{SO}_4^{2-}$  (2500);  $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{CO}_3^{2-}$  (2000); 酪氨酸 (6000); 三氯乙酸 (5000);  $\text{Fe}^{3+}$  (500)。大部分共存物质的允许量均较高,不会对 1-OHP 的测定产生干扰。

### 3.8 实际尿样处理与测定

尿液中的 1-OHP 大多是以同葡萄糖苷酸结合成酯的形式存在<sup>[3]</sup>,未经水解处理的尿样的同步荧光光谱与 1-OHP 标准溶液的光谱存在较大差异(图 5),故尿样在测定前需进行水解处理。

实验采用碱水解方法处理实际尿样。参照文献[15]并适当改进,具体处理方法如下:取 10 mL 充分混匀的尿样,加入 2 mL  $0.50 \text{ g/mL}$   $\text{NaOH}$  溶液,于沸水浴中避光水解 3.5 h 后,用  $\text{HCl}$  调节至  $\text{pH} 2.0 \sim 3.0$  分取正己烷各 6 mL 提取两次,合并有机相;在  $37^\circ\text{C}$  避光条件下吹氮气浓缩至近干,残渣用 0.5 mL 乙醇-水 (1:1, V/V) 溶解,取适量该溶液用于荧光测定。图 5 中曲线 2 是经过碱水解处理的尿样的同步荧光光谱,其同步特征峰的形状及峰位置与 1-OHP 标准溶液的同步特征峰基本相同。实际

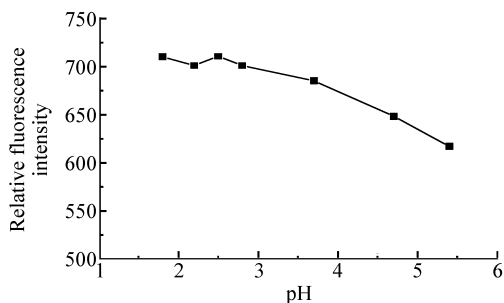


图 3 pH 对同步荧光强度的影响

Fig. 3 Influence of pH on synchronous fluorescence intensity

1-OHP 溶液, Triton X-100 吐温 20 吐温 40 可

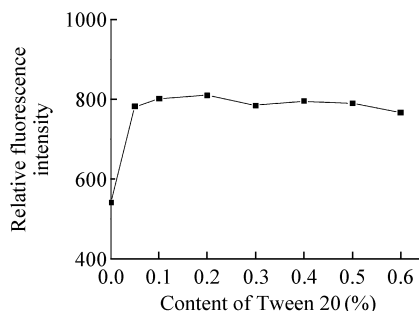


图 4 吐温 20 含量对同步荧光强度的影响

Fig. 4 Influence of Tween 20 content on synchronous fluorescence intensity

尿样的分析结果及加标回收实验见表 1, 回收率在 93. 8% ~ 107. 4% 之间。

表 1 人尿中 1-羟基芘的测定和回收率实验 (n = 3)  
Table 1 Determination results and recovery tests of 1-hydroxypyrene in human urine samples (n = 3)

尿样 Urine sample	测得量 Content ( $\times 10^{-8}$ mol/L)	加标量 Added ( $\times 10^{-8}$ mol/L)	测得总量 Found ( $\times 10^{-8}$ mol/L)	回收率 Recovery (%)
1	1.53 ± 0.07	1.00	2.60 ± 0.06	107.4
		1.50	2.99 ± 0.04	97.6
		3.00	4.38 ± 0.23	95.2
2	0.83 ± 0.04	1.00	1.80 ± 0.01	97.4
		1.50	2.24 ± 0.05	93.8
		2.00	2.84 ± 0.07	101.2
3	1.25 ± 0.05	2.40	3.45 ± 0.07	93.9
		3.00	4.21 ± 0.16	96.8
		4.50	5.50 ± 0.10	94.4

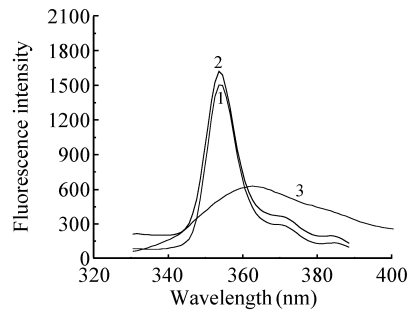


图 5 尿样和 1-羟基芘标准溶液的同步荧光光谱  
Fig 5 Synchronous fluorescence spectra of urine samples and 1-hydroxypyrene standard solution  
1 1-OHP 标准溶液 (1-Hydroxypyrene standard solution);  
2 碱水解处理的尿样 (Urine by alkaline hydrolysis);  
3 未经处理的尿样 (Untreated urine (no alkaline hydrolysis))。

与文献报道的其它测定 1-OHP 的荧光方法相比, 本方法采用碱水解处理尿样, 操作条件较为简单, 不需要水解酶, 易于操作, 重现性好, 回收率好, 灵敏度高, 可以测定低至 0.055  $\mu\text{g/L}$  的 1-OHP。

References

- JIN Dan(金丹), ZHANG Yu-Jun(张玉钧), LI Guo-Gang(李国刚), XIAO Xue(肖雪), WANG Zhi-Gng(王志刚), YIN Gar-Fang(殷高方), ZHAO Nan-Jing(赵南京), LIU Wen-Qing(刘文清). *Journal of Atmospheric and Environmental Optics*(大气与环境光学学报), **2008**, 3(6): 448~453
- Jongeneel F J *Toxicology Letters*, **1994**, 72(1-3): 205~211
- Jacob J Seile A. *J. Chromatogr. B*, **2002**, 778(1-2): 31~47
- Jongeneel F J Anzion R B M, Henderson P T. *J. Chromatogr. B*, **1987**, 413: 227~232
- Kuo C T, Chen H W, Chen J L. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 805(2): 187~193
- Chen H W. *Anal. Sci.*, **2007**, 23(10): 1221~1225
- Cahours X, Blanchet M, Rey M. *Journal of Separation Science*, **2009**, 32(20): 3403~3410
- van de Wiele T R, Peru K M, Verstraete W, Siciliano S D, Headley J V. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 806(2): 245~253
- Campo L, Rossella F, Fustinoni S. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 875(2): 531~540
- Mattarozzi M, Musci M, Caerri M, Mangia A, Fustinoni S, Campo L, Bianchi F. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216(30): 5634~5639
- Fan R F, Dong Y L, Zhang W B, Wang Y, Yu Z Q, Sheng G Y, Fu J M. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 836(1-2): 92~97
- Xu L, Spink D C. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 855(2): 159~165
- Pignati D, Cappelletta A M, Faranda P, Tranf G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2006**, 20(6): 1013~1018
- Schievok R, Schellentrager M, Monnikes R, Lorenz M, Giese R, Brockmann K J, Gab S, Benter T, Schmitz O. *J. Anal. Chem.*, **2007**, 79(11): 4135~4140
- OUYANG Yun-Fu(欧阳运富), WANG Yong-Sheng(王永生), XUE Jin-Hua(薛金花), WANG Ying(王英). *Chinese Journal of Analysis Laboratory*(分析试验室), **2007**, 26(11): 53~56
- ZHAO Zhen-Hua(赵振华), TIAN De-Hai(田德海), QUAN Wen-Yi(全文熠). *Environmental Chemistry*(环境化学), **1994**, 13(2): 141~145
- ZHANG Yong(张勇), WANG Shu-Hong(王淑红), ZHU Ya-Xia(朱亚先), Lan M H W, Wu R S S, HONG Hua-Sheng(洪华生). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2002**, 30(4): 467~469
- Yang H M, Wang Y S, Li J H, Li G R, Wang Y, Tan X, Xue J H, Xiao X L, Kang R H. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 636(1): 51~57

## Determination of 1-Hydroxypyrene in Human Urine by Synchronous Fluorescence Spectrometry with Tween 20 as Enhancer

ZHANG Yue MA Rui FAN ShiHua\*

(Research Center for Analytical Science, Northeastern University, Shenyang 110004)

**Abstract** 1-Hydroxypyrene (1-OHP) is a metabolite of pyrene, a member of the class of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) that include the toxic properties of carcinogenicity in some cases. The determination of 1-hydroxypyrene in human urine is used as a biological indicator for exposure to PAHs. In this study, a new method for the determination of 1-OHP in human urine by synchronous fluorescence spectrometry was proposed. The measurement was carried out in a Britton-Robinson buffer solution ( $\text{pH } 2.6$ ) with  $\Delta\lambda = 34 \text{ nm}$  for synchronous scanning using Tween 20 as an enhancer. The linear range of the calibration curve was over  $2.6 \times 10^{-10} - 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ , with a detection limit ( $3\sigma$ ) of  $9.5 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$  for 1-OHP. The relative standard deviation (RSD) of the method for  $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$  1-OHP was 0.8% ( $n = 11$ ). The proposed method provided a relatively simple, convenient, and practical procedure to determine the level of urinary 1-hydroxypyrene in biological samples, and was applied to the determination of 1-OHP in human urine samples with the recoveries of 93.8% - 107.4%.

**Keywords** 1-Hydroxypyrene; Synchronous fluorescence; Urine; Tween 20

(Received 9 December 2009; accepted 3 March 2010)

### 2010 中日韩分析化学研讨会征文通知 (第一轮)

#### (2010 China-Japan-Korea Symposium on Analytical Chemistry)

由武汉大学主办, 中国国家自然科学基金委员会、日本分析化学会、韩国分析化学会及中日韩分析化学恳谈会后的 2010 中日韩分析化学研讨会定于 2010 年 10 月 31 日 ~ 11 月 2 日在武汉召开。会议将邀请来自日本、韩国和国内的著名专家参会。会议主题为生物医药分析, 会议语言为英语。

凡未在刊物上公开发表和未在学术会议上宣读过的反映分析化学基础研究、新技术、新方法的发展和应用的论文或综述, 均可向本次会议投稿。论文摘要直接通过本网站投稿, 论文截止日期 2010 年 8 月 31 日。经会议学术委员会审查录用的会议征文, 将收入大会论文集。会议英文摘要格式详见会议网站通知。

没有论文只参加会议的各界人士, 也请于 2010 年 8 月 31 日前与会务组联系, 以便继续为您寄发下一轮通知。本会热诚欢迎国内外分析仪器公司和厂商到会介绍和展出产品, 有关具体事宜, 请与会议秘书组联系。

会议网站: <http://zchenlab.whu.edu.cn/cjk2010>

联系人: 陈子林 Email: [chenz@whu.edu.cn](mailto:chenz@whu.edu.cn) 电话: 027-68759893