

· 监测与检验 ·

衍生化-气相色谱-质谱法测定人体尿液中 2-硫代噻唑烷-4-羧酸

Determination of *L*-thiazolidine-4-carboxylic acid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization

马鲲鹏, 沈悦, 张广妍, 闵珍

(同济大学附属上海市肺科医院中毒科, 上海 200353)

摘要: 人体尿液中的 2-硫代噻唑烷-4-羧酸在甲醇和吡啶的催化下与氯甲酸丙酯发生反应, 衍生产物经三氯甲烷液液萃取, 经 HP-5 色谱柱分离后, 进入质谱分析, 以选择离子监测模式 (SIM) 进行测定。2-硫代噻唑烷-4-羧酸在 0.05~10.0 mg/L 的浓度范围内呈良好的线性关系, 相关系数 > 0.999, 方法检出限为 0.01 mg/L, 定量下限为 0.03 mg/L; 批内精密密度为 2.74%~3.60%, 批间精密密度为 2.36%~3.98%; 样品加标回收率为 95.0%~97.5%, 可以满足二硫化碳接触者尿液中 2-硫代噻唑烷-4-羧酸的检测要求。

关键词: 衍生化; 气相色谱-质谱; 尿; 2-硫代噻唑烷-4-羧酸

中图分类号: R446.12; O612.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2019)03-0234-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2019.03.028

二硫化碳广泛应用于各种工业领域, 常用于生产黏胶纤维、玻璃纸、橡胶硫化加工等。长期密切接触可导致以神经系统损害为主的全身性疾病。目前, 我国 WS/T40—1996 检测尿中二硫化碳代谢产物 2-硫代噻唑烷-4-羧酸 (TTCA) 采用液相色谱法^[1]。通常尿液中的基质成分较为复杂, 会对液相色谱分离产生干扰, 影响方法的准确度和灵敏度。本研究对尿液中的 TTCA 进行衍生化处理, 使之形成单一的衍生产物, 衍生产物经液液萃取分离, 直接 GC-MS 进样检测。该方法灵敏、准确, 且简便快速。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

Agilent 6890A /5975N 气相色谱-质谱联用仪, 配有 Agilent 7683 自动进样器, Agilent DB-5MS 毛细管柱 (0.25 mm), Agilent 色谱工作站和 NIST2002 质谱数据库; KIA-MS3 涡旋混匀器 (德国); Millipore 纯水仪。TTCA (HPLC)、氯甲酸丙酯 (MCF, 99%)、N,O-双三甲基硅基三氟乙酰胺 (MSTFA, 含三甲基氯硅烷) 均购自阿拉丁, 甲醇、吡啶、三氯甲烷均为色谱纯, 购自 Fisher 公司; 氢氧化钠、碳酸氢钠、无水硫酸钠均为分析纯; 实验用水为 2 级去离子水。

1.2 方法

1.2.1 标准曲线的绘制 准确称取 10.0 mg TTCA 于 10ml 容量瓶中, 配制成 1.0 mg/ml 的标准储备液, 再分别配制成 0.05、0.1、0.5、1.0、10.0 mg/L 的标准溶液。取标准系列溶液各 100 μ l 于具塞样品瓶中, 依次加入 200 μ l 0.10 mol/L 的氢氧化钠溶液, 160 μ l 甲醇, 40 μ l 吡啶, 混匀后加入 20 μ l 氯甲酸丙酯, 混匀 30 s, 静置 10 s 后再加入 20 μ l 氯甲酸丙酯, 混匀 30 s, 加入 200 μ l 三氯甲烷, 混匀 10 s 以提取衍生产物, 待溶液分层后加入 400 μ l 0.05 mol/L 碳酸氢钠溶液, 混匀、静置分层后弃去上层溶液, 下层萃取液经无水硫酸钠干燥后, 进样 1 μ l, 进行气相色谱-质谱测定, 以保留时间、衍生产物 *m/z* 和峰面积进行定性定量。

1.2.2 色谱条件 程序升温: 初始柱温 60 $^{\circ}$ C, 保持 2 min, 以 30 $^{\circ}$ C/min 升至 180 $^{\circ}$ C, 再以 20 $^{\circ}$ C/min 升温至 260 $^{\circ}$ C; 进样口温度 250 $^{\circ}$ C; 不分流进样, 进样量 1 μ l; 载气: 氦气 (纯度 \geq 99.999%), 流速 1.0 ml/min。

1.2.3 质谱条件 离子化方式: EI 离子源 (70 eV), 离子源温度 200 $^{\circ}$ C, 传输线温度为 260 $^{\circ}$ C, 检测质荷比范围 30~600, 溶剂延时 4.5 min; 扫描速度: 20 张图谱/s。

1.2.4 样品处理 用 15 ml 聚乙烯塑料管收集职业接触工人的班末尿样, 置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 尽快分析。取混匀尿样 100 μ l 于样品瓶中, 同时取 100 μ l 去离子水作为空白对照, 其余步骤同标准溶液操作。TTCA 衍生后的 TIC 质谱图见图 1, 经衍生后产生了单一的衍生产物。保留时间为 11.62 min, 定性离子是 88.1、147.1、174.1, 定量离子是 147.1。

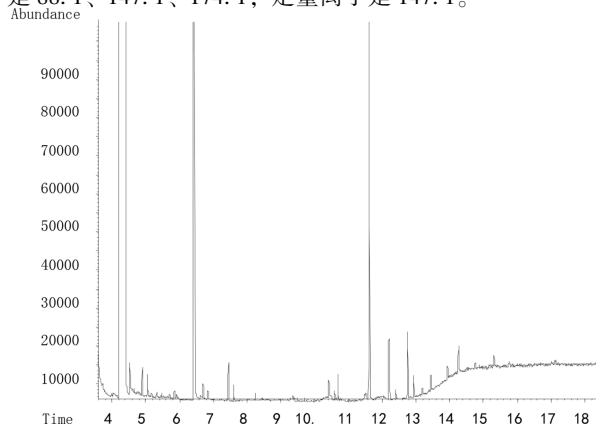


图 1 TTCA 单一衍生产物质谱

收稿日期: 2018-07-16; 修回日期: 2018-09-20

作者简介: 马鲲鹏 (1984—), 男, 硕士研究生, 主要从事职业卫生检测。

通信作者: 闵珍, 主管技师, E-mail: mzl133@163.com。

2 结果

2.1 衍生化方法的选择

TTCA 的沸点较高, 不适合直接进样气相色谱-质谱检测, 因此, 为便于检测, 本实验考虑将其衍生化为低沸点物质。硅烷化是有机酸柱前衍生化的主要方法, 本实验使用 MSTFA 作为催化剂, 溶液经高纯氮气吹干, 干燥条件下 70℃ 加热 30 min, 发现 TTCA 硅烷化后的衍生物存在多个副产物, 导致定量困难, 且衍生过程中样品中的水分若未完全除去会严重影响衍生物的形成, 使用氯甲酸酯类对 TTCA 进行间接烷基化衍生^[2-4]。TTCA 与氯甲酸丙酯间接烷基化反应可直接在液相中进行, 不必事先去除尿液蛋白。甲醇和吡啶在衍生的过程中起催化作用, 氢氧化钠可以中和反应产物, 加入碳酸氢钠调节反应溶液的 pH 值。TTCA 与衍生化试剂反应非常迅速, 较硅烷化衍生大大缩短了前处理时间, 衍生物通过液液萃取直接进入质谱仪检测。

2.2 衍生试剂加入量和时间的优化

本实验选择 MCF 作为衍生化试剂, 因 MCF 毒性较强, 在溶液中分别加入 10、20、50 μl MCF 进行衍生反应, 实验显示

20 μl MCF 可完成衍生化过程, 考虑到尿液中其他有机酸的影响, 重复加入 1 次 MCF 以使反应更加完全。实验表明, 衍生化反应 30 s 后衍生产物基本稳定。

2.3 线性关系及检出限和定量下限

按照优化的条件参数测定 TTCA 衍生产物的标准溶液, 以保留时间和 m/z 进行定性, 峰面积定量, 计算 TTCA 在 0.05~10.0 mg/L 的线性回归方程为 $y = 2.188 \times 10^5 x - 10327$, 相关系数 $r = 0.9996$; 以 3 倍信噪比计算其检出限为 0.01 mg/L, 定量下限为 0.03 mg/L; 尿中最低检测浓度为 0.01 mg/L, 最低定量浓度为 0.03 mg/L。

2.4 精密度实验

以空白尿样为本底, 分别添加低、中、高三种浓度的 TTCA, 按照本方法测定, 每个浓度设定 6 个样本, 计算批内精密度, 各组测定结果的相对标准偏差 (RSD) 为 2.74%~3.60%; 在两周内分别添加 3 个浓度的样品, 以相同方法分别测定 6 次, 计算批间精密度 (RSD) 为 2.36%~3.98%。结果见表 1。

表 1 精密度实验结果

| TTCA 浓度 (mg/L) | n | 批内精密度 | | 批间精密度 | |
|----------------|---|-----------------|---------|-----------------|---------|
| | | $\bar{x} \pm s$ | RSD (%) | $\bar{x} \pm s$ | RSD (%) |
| 0.10 | 6 | 0.095±0.0024 | 2.74 | 0.094±0.0025 | 2.90 |
| 1.0 | 6 | 0.980±0.031 | 3.54 | 0.960±0.035 | 3.98 |
| 10 | 6 | 9.65±0.32 | 3.60 | 9.44±0.20 | 2.36 |

2.5 方法的准确度

以空白尿样为本底, 分别添加高、中、低三种浓度的 TTCA, 每个浓度取 6 个样品, 按照本方法测定, 计算样品加

标回收率, TTCA 的平均加标回收率为 95.0%~97.5%。结果见表 2。

表 2 加标回收实验结果

| 加标浓度 (mg/L) | 测定值 (mg/L) | | | | | 平均浓度 (mg/L) 回收率 (%) | | |
|-------------|------------|-------|-------|-------|-------|---------------------|-------|------|
| 0.10 | 0.097 | 0.091 | 0.093 | 0.095 | 0.096 | 0.098 | 0.095 | 95.0 |
| 1.0 | 0.94 | 0.98 | 0.96 | 0.97 | 0.96 | 1.04 | 0.975 | 97.5 |
| 10 | 10.26 | 9.58 | 9.46 | 9.77 | 9.23 | 9.62 | 9.650 | 96.5 |

2.6 尿样的稳定性

选择加标浓度为 1.0 mg/L 的 6 支尿样分装于 1.5 ml 离心管中, 置于 -20℃ 冰箱中保存, 分别于 0、3、7、14 d 后取样品测定含量, 取平均值。结果见表 3。

表 3 样品稳定性试验结果

| 保存时间 (d) | 平均浓度 (mg/L) | 下降率 (%) |
|----------|-------------|---------|
| 0 | 0.96 | |
| 3 | 0.95 | 1.4 |
| 7 | 0.93 | 3.12 |
| 14 | 0.90 | 6.25 |

由表 3 结果可知, -20℃ 保存 14 d 样品浓度下降 < 10%, 因此, 样品至少可以在 -20℃ 环境下保存 14 d, 以保证尿样的稳定性。

2.7 实际样品的测定

采用本方法对 24 名职业暴露二硫化碳工人尿中 TTCA 进行测定, 结果显示, 2 人未检出, 22 人检出浓度为 0.54~1.62 mg/L。

3 结论

通过实验条件的优化, 建立了衍生化气相色谱质谱法检测尿液中 TTCA 的方法。该法操作简单, 灵敏度高, 能满足实际工作中监测的要求, 适用于职业中毒的应急检测及常规职业健康检测。

参考文献:

[1] WS/T40—1996, 尿中 2-硫代噻唑啉-4-羧酸的高效液相色谱法 [S].
 [2] Husek, Simek. Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis [J]. Curr Pharm Anal, 2006 (2): 23-43.
 [3] Vilas-Boas SG, Delcado DG. Simultaneous analysis of amino and nonamino organic acid as methyl chloroformate derivatives using gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 2003, 322 (1): 134-138.
 [4] Kaspar H, Dettmer K. Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids [J]. Chromatography B, 2008, 870 (2): 222-232.