

论著 DOI: 10.16369/j.oh.er.issn.1007-1326.2023.03.021

· 实验研究 ·

控制三氯甲烷干扰后用顶空-气质联用法 测定尿中三氯乙酸

何宗剑, 周武旺, 李燕, 肖梅, 朱杰

广西壮族自治区职业病防治研究院理化检测所, 广西 南宁 530021

摘要:目的 建立能解决三氯甲烷干扰的尿中三氯乙酸顶空-气质联用测定方法。方法 利用三氯乙酸水浴加热脱羧后形成三氯甲烷的原理,使用顶空-气质联用法分别检测样品水浴前、水浴后的三氯甲烷峰面积,依据峰面积差值对应的浓度计算三氯乙酸浓度。结果 采用该方法测定尿中三氯乙酸,在0.01~50 mg/L范围内线性良好,相关系数为0.999 9,方法检出限0.2 μg/L,回收率为96.8%~100.4%,相对标准偏差为1.5%~2.3%。样品在室温、4℃和-25℃中可保存14 d。三氯甲烷低于10 mg/L时对测定无干扰。结论 该方法简便、快捷、准确,适用于职业人群和中毒患者尿中三氯乙酸的测定。

关键词:三氯乙酸;尿;顶空;气质联用;三氯甲烷

中图分类号: R115;O657 文献标志码: A 文章编号: 1007-1326(2023)03-0366-04

引用:何宗剑,周武旺,李燕,等.控制三氯甲烷干扰后用顶空-气质联用法测定尿中三氯乙酸[J].职业卫生与应急救援,2023,41(3):366-369.

Determination of urinary trichloroacetic acid by headspace gas chromatography mass spectrometry after controlling chloroform interference HE Zongjian, ZHOU Wuwang, LI Yan, XIAO Mei, ZHU Jie (Department of Physical and Chemical Testing, Guangxi Zhuang Autonomous Region Academy for the Prevention and Treatment of Occupational Diseases, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To establish a headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) method for determining trichloroacetic acid (TCA) in urine that can solve the interference of chloroform. **Methods** According to the principle that trichloroacetic acid transforms into chloroform after heating and decarboxylation in a water bath, the HS-GC-MS method was used to detect the peak area of chloroform before and after the water bath of the sample, and the accurate concentration of TCA was calculated according to the difference in peak area. **Results** The method was used to determine TCA in urine, and it showed good linearity in the range of 0.01-50 mg/L, with a correlation coefficient of 0.999 9, a detection limit of 0.2 μg/L, a recovery rate of 96.8%-100.4%, and a relative standard deviation of 1.5%-2.3%. The sample can be stored at room temperature, 4 °C, or -25 °C for 14 days without degradation. When chloroform was less than 10 mg/L, there was no interference with the determination. **Conclusions** The method is simple, fast, and accurate and is suitable for determining TCA in the urine of occupational populations and poisoned patients.

Keywords: trichloroacetic acid; urine; headspace; gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS); chloroform

三氯乙烯是一种常用的有机溶剂,广泛应用于五金、化工、电子等行业。三氯乙烯具有致癌性,职业性三氯乙烯药疹样皮炎因其高致死率以及严重的皮肤和肝功能损害,是我国危重职业病之一,近年来有多例职业接触三氯乙烯引起的中毒甚至中毒死亡的报道^[1-4]。三氯乙烯主要的代谢产物是三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA),我国以尿中 TCA

质量浓度 50 mg/L 作为三氯乙烯职业接触的生物限值^[5]。

目前国内测定尿中 TCA 的方法主要有顶空-气相色谱法或气质联用法^[6-11]、衍生化-液液萃取-气相色谱法^[12-14]、顶空固相微萃取-气质联用法^[15]、离子色谱法^[16]、液相色谱法^[17-18],衍生萃取法、离子色谱法和液相色谱法的前处理过程繁琐,需要消耗大量试剂。现行行业标准及报道比较多的方法是顶空法,简便快捷。顶空法测定是先将 TCA 水浴加热脱羧成三氯甲烷,然后通过顶空进样,检测三氯甲烷

基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会课题(Z20211115)

作者简介:何宗剑(1987—),男,学士,工程师

通信作者:李燕,高级工程师,E-mail:1139659701@qq.com

来测定 TCA。但是,未见有报道说明样品测定的三氯甲烷是尿中既有的,还是由 TCA 加热脱羧生成的,即无法排除既有三氯甲烷的干扰。

本研究拟通过顶空-气质联用法分别检测样品加热前、加热后的三氯甲烷峰面积,峰面积差值对应浓度即为准确的尿中三氯乙酸浓度,建立能抗三氯甲烷干扰的尿中三氯乙酸顶空-气质联用测定方法,准确测定职业人群和中毒患者尿中三氯乙酸含量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

7694E-7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 科技公司);AE-200 电子天平(感量 0.1 mg,瑞士梅特勒公司);HH-4 恒温水浴锅(常州国华电器公司);20 mL 顶空钳口玻璃瓶;纯水机(美国密理博公司)。

1.1.2 试剂

三氯甲烷(色谱纯,天津市津科精细化工研究所);三氯乙酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。实验所用纯水:纯水煮沸,冷却至室温。空白混合尿液:取多名健康志愿者尿液混合,经测定尿中 TCA 质量浓度小于检出限。

1.2 仪器条件

1.2.1 顶空条件

顶空瓶温度:55 ℃;定量圈温度:70 ℃;传送带温度:90 ℃。加热平衡时间:10 min;加压时间:0.2 min;定量圈充满时间:0.2 min;定量圈平衡时间:0.05 min。进样体积:1 mL。

1.2.2 气相色谱条件

色谱柱 DB-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm;柱温:45 ℃保持 2 min,以 20 ℃/min 程序升温升至 145 ℃,保持 1 min;进样口温度 230 ℃;柱流速 1 mL/min;进样方式:分流进样,分流比 10:1。

1.2.3 质谱条件

电子电离(electron ionization, EI)源;离子源温度:230 ℃;接口温度 250 ℃;扫描方式:全扫描模式;扫描范围:质荷比(m/z)45 ~ 300。采用保留时间和特征离子碎片(m/z 为 83、85、47)进行定性,采用定量离子(m/z 为 83)峰面积进行定量。

1.3 标准曲线

1.3.1 标准溶液配制

分析天平准确称量 TCA 纯品,使用纯水溶解并定容至 100 mL,配制成约 10 g/L 的 TCA 贮备液,将

此贮备液置于 4 ℃ 冰箱保存。临用前用纯水稀释成 100 mg/L 的标准应用液。

1.3.2 标准曲线绘制

取 8 个顶空瓶,分别加入一定量的 TCA 标准应用液,加纯水至 5 mL,配成浓度为 0、0.01、0.10、1.00、5.00、10.00、50.00 mg/L 的标准溶液,钳紧顶空瓶盖,放入 90 ℃ 水浴锅中保持 90 min,取出放至室温后,放入顶空进样器中,按步骤 1.2 仪器条件测定。以 TCA 浓度为横坐标,以各标准溶液点测得的定量离子峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.4 样品测定

分别取尿液样品 5.0 mL 于两个顶空瓶中,立即钳紧瓶盖,其中一个顶空瓶放入顶空进样器,按步骤 1.2 仪器条件测定得到定量离子峰面积 A_1 ;另一个顶空瓶放入 90 ℃ 水浴锅中保持 90 min,取出放至室温后,放入顶空进样器中,按步骤 1.2 仪器条件测定得到定量离子峰面积 A_2 。根据标准曲线,峰面积的差值($A_2 - A_1$)对应的 TCA 质量浓度即为准确尿液中 TCA 的质量浓度(mg/L)。

2 结果与讨论

2.1 水浴温度和时间的选择

根据 TCA 的行业标准检测方法及相关报道,脱羧温度均选择 90 ℃^[6-11]。因此本研究选择水浴温度为 90 ℃ 进行脱羧反应。在其他条件相同的情况下,本研究选择了水浴脱羧时间分别 0、30、60、90、120、150、180 min 进行试验。结果显示,随着时间增加,测定峰面积逐渐增大,当水浴时间超过 90 min 时,峰面积变化不大。因此本文选择水浴脱羧时间为 90 min。见图 1。

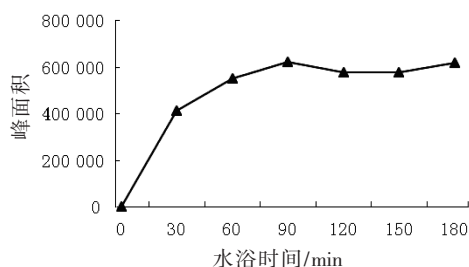


图 1 水浴时间对峰面积的影响

2.2 顶空时间的选择

将浓度 50 mg/L 的 TCA 标准溶液经过 90 ℃ 水浴 90 min,取出放至室温后,放入顶空进样器中,顶空温度为 55 ℃,分别选择顶空时间为 5、10、20、30 min 进行试验。结果显示,顶空时间 10 min 时,峰面积最大,因此本文选择顶空时间为 10 min。见图 2。

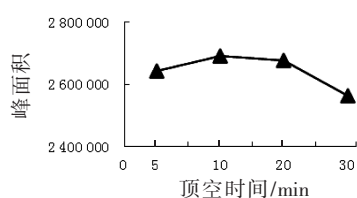


图2 顶空时间对峰面积的影响

2.3 顶空温度的选择

本研究考察了TCA样品、三氯甲烷样品在有、无水浴的情况下,不同顶空温度对测定结果的影响。

2.3.1 顶空温度对TCA样品峰面积的影响

将浓度50 mg/L的TCA标准溶液分为两组:1组不水浴、1组水浴,然后分别于顶空温度45、55、65、75℃下平衡10 min后测定。结果显示,随着顶空温度升高,不水浴样品的峰面积逐渐增大;水浴样品的峰面积逐渐增大,温度超过65℃后,峰面积减小。见表1。

表1 顶空温度对TCA样品峰面积的影响

顶空温度/℃	峰面积	
	不水浴	水浴
45	1 441	2 515 709
55	2 000	2 553 632
65	3 928	3 632 643
75	14 616	2 525 061

2.3.2 顶空温度对三氯甲烷样品峰面积的影响

将浓度10 mg/L的三氯甲烷标准溶液分为两组:1组不水浴、1组水浴,然后分别于顶空温度45、55、65、75℃下平衡10 min后测定。结果显示,随着顶空温度升高,不水浴样品的峰面积逐渐增大;水浴样品峰面积逐渐减小,在55℃时三氯甲烷样品在水浴和无水浴的测定结果相对相差小于1%。见表2。

表2 顶空温度对三氯甲烷样品峰面积的影响

顶空温度/℃	峰面积	
	不水浴	水浴
45	931 240	1 046 236
55	988 588	980 304
65	1 133 337	788 413
75	1 146 732	732 044

2.3.3 水浴对TCA样品峰面积的影响

将浓度为5、10、50、100、150 mg/L的TCA标准溶液分为两组:1组不水浴、1组水浴,然后于顶空温度55℃下平衡10 min后测定。结果显示,顶空温度为55℃时,不同浓度的TCA在不水浴时测定结

果与水浴时测定结果的比值均小于0.2%。见表3。

表3 不同浓度TCA样品水浴、不水浴的测定结果

TCA质量浓度/(mg/L)	不水浴样品峰面积	水浴样品峰面积	峰面积比值/%
5	0	261 280	0
10	309	512 465	0.06
50	1 138	2 424 122	0.05
100	4 363	4 142 133	0.11
150	5 715	5 622 238	0.10

注:峰面积比值指不水浴样品峰面积与水浴样品峰面积的比值。

根据以上实验结果,本研究选择顶空温度为55℃,在水浴后测定能保持较高的峰面积,满足样品中TCA在不水浴时测定结果(c_1)不影响水浴后测定的结果(c_2),同时样品中的三氯甲烷在不水浴、水浴的情况下测定结果相对相差小于1%。

2.4 标准曲线和检出限

按照优化后的条件,将TCA质量浓度为0、0.01、0.10、1.00、5.00、10.00、50.00 mg/L的标准溶液,按上述步骤1.3.2进行测定,绘制线性方程。TCA质量浓度在0.01~50.00 mg/L的范围内线性良好、相关系数(r)为0.999 9。以质量浓度为0.01 mg/L TCA溶液中定量离子响应的3倍信噪比(S/N)对应的样品浓度作为检出限,以10倍信噪比对应的样品浓度作为定量限,结果本方法检出限为0.2 μg/L,定量限为0.5 μg/L。

2.5 方法加标回收率和精密度

取混合尿样分为5组,每组6个样品,1组为空白,其余4组分别加入TCA的质量浓度为1、10、25、50 mg/L,按步骤1.4进行测定。测定结果减去空白结果后,计算加标回收率和相对标准偏差。加标回收率在96.8%~100.4%之间,相对标准偏差在1.5%~2.3%之间。见表4。

表4 方法加标回收率和精密度($n=6$)

加标质量浓度/(mg/L)	加标回收率/%						平均回收率/%	RSD/%
	1	2	3	4	5	6		
1	101.0	102.5	101.2	102.2	99.2	96.5	100.4	2.3
10	101.3	97.3	96.7	97.4	98.2	96.8	98.0	1.7
25	99.8	97.5	97.7	95.8	96.4	96.0	97.2	1.5
50	96.0	100.2	95.6	97.9	95.7	95.4	96.8	2.0

2.6 稳定性试验

将TCA质量浓度为50 mg/L的尿液样品分成3组,分别置于室温(25~30℃)、4℃、-25℃中保存,分别在第1、3、7、14天各测定1组样品,计算下降率。结果显示,在室温、4℃和-25℃保存3、7、14 d时,TCA下降率均小于10%。说明样品可在室温、4℃和-25℃保存14 d。

2.7 干扰试验

顶空法测定尿中 TCA 的干扰物主要是三氯甲烷,即无法分辨测定的三氯甲烷是尿中既有的,还是由 TCA 脱羧生成的。试验:分别将 TCA 质量浓度为 0、10 mg/L 的尿液样品分成 4 组,1 组不加干扰物,其余 3 组分别加入 1、10、50 mg/L 的三氯甲烷,按步骤 1.4 进行测定。结果显示,空白尿液中随着三氯甲烷浓度增大,导致空白尿液中 TCA 测定结果从无到有、逐渐增大。在 10 mg/L TCA 尿液样品中,随着三氯甲烷的浓度增大,TCA 测定结果逐渐减小,即测定结果受到三氯甲烷水浴前、水浴后峰面积变化的影响,同时三氯甲烷的存在会抑制三氯乙酸的脱羧反应,从而导致测定结果偏低。与不加干扰物样品测得结果比较,当三氯甲烷浓度低于 10 mg/L 时,对本研究测定结果造成的相对偏差小于 $\pm 10\%$,表示无干扰。见表 5。

表 5 干扰试验

TCA 加标浓度/ (mg/L)	三氯甲烷浓度/ (mg/L)	测定结果/ (mg/L)	偏差(mg/L)
0	0	0	0
	1	0	0
	10	0.3	0.3
	50	4.0	4.0
10	0	9.7	0
	1	9.5	-0.2
	10	8.8	-0.9
	50	6.3	-3.4

3 结论

本方法采用顶空-气质联用法测定尿中 TCA,从干扰试验、水浴时间、顶空平衡温度、顶空平衡时间等方面优化实验条件,建立了能抗三氯甲烷干扰的尿中三氯乙酸顶空-气质联用测定方法。实验期间,本研究将标准曲线做到 100、150 mg/L,但响应值不符合线性拟合,符合二次方程拟合。样品直接取样、密封、水浴、上机测定,样品前处理操作简便。水浴脱羧 90 min,顶空平衡和气质联用分析 10 min,可同时处理多个样品。本方法简便、快捷、准确,适用于职业人群和中毒患者尿中三氯乙酸的测定。

作者声明 本文无实际或潜在的利益冲突

参考文献

- [1] 张惠英,黎荣光,蔡敏威. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎 1 例死亡原因调查 [J]. 职业卫生与应急救援, 2021, 39 (5): 582-585.
- [2] 全亚宁,王尊,李素娜. 20 例职业性三氯乙烯中毒致多脏器损害患者的超声影像分析 [J]. 工业卫生与职业病, 2020, 46 (4): 335-336.
- [3] 石家琦,鲁严. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎 [J]. 临床皮肤科杂志, 2019, 48(5): 311-313.
- [4] 金佳纯,黄健,柳柳,等. 广东省职业性三氯乙烯药疹样皮炎病例分布特征分析 [J]. 中国职业医学, 2019, 46 (3): 302-306.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 工作场所有害因素职业接触限值 第 1 部分: 化学有害因素: GBZ 2.1—2019 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [6] 施逸岚,杨清华,杨娟,等. 顶空-气相色谱法测定尿中 TCA 方法的改进 [J]. 职业与健康, 2022, 38(11): 1560-1562; 1566.
- [7] 杨清华,施逸岚,顾俊,等. 顶空气相色谱法检测尿二氯乙酸和三氯乙酸 [J]. 预防医学, 2022, 34(2): 213-216.
- [8] 彭珊苗,魏明至,王凯,等. 辽宁省一般人群尿中三氯乙酸水平研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2016, 29(1): 33-35.
- [9] 李添娣,易娟,张文,等. 顶空气相色谱-质谱联用法测定尿中三氯乙酸 [J]. 中国职业医学, 2013, 40(1): 68-70.
- [10] 李添娣,易娟,张文,等. 测定尿中三氯乙酸的自动顶空气相色谱法 [J]. 职业与健康, 2012, 28(16): 1982-1983.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 尿中三氯乙酸顶空气相色谱测定方法: WS/T 96—1996 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [12] 邵吉,施燕鹏,单晓月,等. 分散液-液微萃取-气相色谱法测定尿中三氯乙酸 [J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(14): 1996-1999.
- [13] 叶海朋,周凯,江阳. 甲酯化衍生-液液萃取-气相色谱法测定尿中三氯乙酸 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25 (8): 1149-1151.
- [14] 阮小林,黄汉林,越飞,等. 衍生化气相色谱法同时测定尿中三氯乙烯的 3 种氯代乙酸代谢产物 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(3): 377-380.
- [15] 李添娣,易娟,周伟,等. 尿中三氯乙酸测定的顶空固相微萃取气质联用法 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2012, 30(8): 623-624.
- [16] 邵国健,郭和光,余娟,等. 离子色谱法测定尿中三氯乙酸 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3): 584-585.
- [17] 刘丽华,张伟亚,潘雅虹,等. 利用界面反应集衍生富集为一体的 HPLC 测定尿样中三氯乙酸的研究 [J]. 分析测试学报, 2014, 33(4): 422-426.
- [18] 刘丽华. 尿样中的四种代谢产物三氯乙酸、2,5-己二酮、苯酚及邻甲酚的 HPLC 测定方法研究 [D]. 沈阳: 东北大学, 2013.

收稿日期: 2022-09-13