

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T 330—2024

尿中 1,2-双羟基-4-(N-乙酰半胱氨酸)-丁烷
测定标准 液相色谱-串联质谱法

Determination standard of 1,2-dihydroxy-4-(N-acetylcysteine)-butane in urine—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2024-03-11 发布

2024-09-01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准为您推荐性标准。

本标准由国家卫生健康标准委员会职业健康标准专业委员会负责技术审查和技术咨询，由中国疾病预防控制中心负责协调性和格式审查，由国家卫生健康委职业健康司负责业务管理、法规司负责统筹管理。

本标准起草单位：山东省职业卫生与职业病防治研究院、山东省疾病预防控制中心、山东省产品质量检验研究院、泰安市疾病预防控制中心、江苏省疾病预防控制中心、复旦大学。

本标准主要起草人：赵敬、程学美、邵华、宋利群、周莉莉、刘冰、张天亮、朱宝立、夏昭林。

尿中 1,2-双羟基-4-(N-乙酰半胱氨酸)-丁烷测定标准 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了测定尿中1,3-丁二烯代谢产物1,2-双羟基-4-(N-乙酰半胱氨酸)-丁烷(DHBMA)的液相色谱-串联质谱法。

本标准适用于职业接触1,3-丁二烯人员尿中1,2-双羟基-4-(N-乙酰半胱氨酸)-丁烷(DHBMA)浓度的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本标准;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本标准。

GBZ/T 295 职业人群生物监测方法 总则

WS/T 97 尿中肌酐分光光度测定方法

WS/T 98 尿中肌酐的反相高效液相色谱测定方法

3 术语和定义

GBZ/T 295界定的术语和定义适用于本标准。

4 原理

尿样经乙酸铵溶液稀释,微孔滤膜过滤后用液相色谱-串联质谱仪检测,以保留时间和特征离子丰度比值进行定性,同位素内标校准曲线法定量。

5 仪器

5.1 漩涡振荡器。

5.2 微孔滤膜: 0.45 μm , 水相。

5.3 具塞聚乙烯塑料瓶: 15 mL、50 mL。

5.4 离心管: 2 mL。

5.5 液相色谱-串联三重四级杆质谱仪(LC-MS/MS)。

仪器操作参考条件:

a) 色谱条件:

——色谱柱: 四乙氧基硅氧烷键合的硅胶颗粒, T3 1.8 μm , 规格: 2.1 mm \times 150 mm;

——柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;

——进样量: 5 μL ;

——流动相: 15 mmol/L乙酸铵(pH: 6.8): 乙腈;

——梯度洗脱条件见表1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流速 $\mu\text{L}/\text{min}$	15 mmol/L 乙酸铵 %	乙腈 %
--	250	97	3
2.00	250	95	5
3.00	250	90	10
5.00	250	70	30
6.50	250	60	40
7.00	250	70	30
7.50	250	90	10
8.00	250	97	3

b) 质谱条件:

- 离子源: 电喷雾离子源;
- 离子化模式: 负离子模式;
- 扫描模式: 多反应监测模式 (MRM);
- 离子源温度 (TEM): 650 °C; 电喷雾离子电压 (IS): -4000 V; 碰撞气 (CAD): 7 psi;
气帘气 (CUR): 45 psi; 雾化气 (GS1): 55 psi; 辅助气 (GS2): 65 psi;
- 多反应监测条件见表2。

表 2 多反应监测条件

化合物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压 v	碰撞电压 eV
DHBMA (定量)	250.0	121.0	-70	-20
DHBMA (定性)	250.0	127.9	-70	-32
DHBMA-D7	257.3	127.7	-55	-18

6 试剂

- 6.1 实验用水: 去离子水。
- 6.2 甲醇: 色谱纯。
- 6.3 异丙醇: 色谱纯。
- 6.4 乙酸铵: 色谱纯。
- 6.5 乙腈: 色谱纯。
- 6.6 DHBMA, 标准物质或标准品 (纯度 $\geq 95\%$)。
- 6.7 DHBMA-D7, 标准物质或标准品 (纯度 $\geq 95\%$)。
- 6.8 乙酸铵溶液 (15 mmol/L): 精确称取 2.31 g 乙酸铵, 置于烧杯中, 加入少量去离子水, 超声 10 min 后, 用去离子水溶解并定容至 2 L, 该溶液 pH 约为 6.8。
- 6.9 标准贮备液: 精确称取适量 DHBMA, 用去离子水溶解并定容, 配制成浓度为 1000.0 mg/L 的标准贮备溶液, 此溶液在 4 °C 条件下可稳定保存 3 个月。
- 6.10 标准应用溶液: 用去离子水将 DHBMA 标准贮备溶液稀释成浓度分别为 10.0 mg/L、1.0 mg/L、100.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准应用溶液。
- 6.11 内标贮备溶液: 精确称取适量 DHBMA-D7, 用去离子水溶解并定容, 配制成浓度为 1000.0 mg/L 的内标贮备溶液。

6.12 内标应用溶液：用去离子水将内标贮备溶液稀释，配制成浓度为 600.0 μg/L 的 DHBMA-D7 内标应用溶液。

7 样品采集、运输和保存

7.1 样品的采集：按 GBZ/T 295 要求采集班末尿液样品 50 mL，置于 2 支具塞聚乙烯塑料瓶，严密封口。

7.2 样品空白的采集：在样品采集过程中，用 50 mL 去离子水代替尿样，加入尿样容器，与样品同时运输和储存，作为样品空白。

7.3 样品应置 4℃ 条件下密封避光保存和运输，样品在 4℃ 条件下可稳定保存 14 d。

8 分析步骤

8.1 肌酐测定：取出 1 支尿液样品，按 WS/T 97 或 WS/T 98 测定尿中肌酐浓度。

8.2 样品处理：尿样置于室温平衡经振荡混匀后，取 100 μL 尿样置于 2 mL 离心管内，加入 50 μL 内标应用溶液，再加入 850 μL 乙酸铵溶液，涡旋混匀，经微孔滤膜过滤后，待测。

8.3 内标标准系列溶液的配制与测定：用乙酸铵溶液将标准应用溶液采用逐级稀释方法配成浓度为 0.0 μg/L~1000.0 μg/L 的 DHBMA 标准系列溶液，并分别加入 50 μL 内标应用溶液。参照仪器操作条件，测定内标标准系列溶液。以测得的 DHBMA 信号值与相应的内标物 DHBMA-D7 的信号值的比值为纵坐标，以 DHBMA 的浓度为横坐标，计算线性回归方程。

8.4 样品测定包括定性测定和定量测定：

——定性测定：按照液相色谱-串联质谱条件测定样品溶液和标准溶液，样品中待分析物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在 ±5% 之内。如果检测样品的待分析物色谱峰保留时间与标准品一致，并且在扣除背景后的质谱图中，待分析物的定性离子和定量离子均出现，且所选的离子相对丰度比与质量浓度相当的标准工作溶液相比，其允许偏差不得超过表 3 规定的范围，则可判定样品中存在待分析物；

——定量测定：用测定标准系列溶液的操作条件检测样品和样品空白溶液，同位素内标校准曲线法进行定量。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (%)	>50	>20~≤50	>10~≤20	≤10
允许的相对偏差 (%)	±20	±25	±30	±50

8.5 质量控制：样品溶液中待分析物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。用接触者混合尿或加标的正常人混合尿作质控样。根据测定仪器的稳定性，在测定前后以及每测定 10 个~30 个样品测定一次质控样和样品空白。

9 计算

按式 (1) 计算尿中 DHBMA 的浓度按式 (1) 计算：

$$\rho_1 = K \frac{\rho_0}{Cr} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_1 ——尿中 DHBMA 的浓度，单位为毫克每克肌酐 (mg/g Cr)；

K ——尿样稀释倍数；

ρ_0 ——测得的待测物浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

Cr ——尿肌酐浓度，单位为克每升 (g/L)。

10 说明

10.1 本方法检出限为 $3.02 \mu\text{g/L}$ ，方法定量下限为 $10.07 \mu\text{g/L}$ ，测定范围为 $3.02 \mu\text{g/L} \sim 1000.0 \mu\text{g/L}$ ，批内精密度的 $1.1\% \sim 4.7\%$ ，批间精密度的 $2.0\% \sim 5.5\%$ ，加标回收率为 $90\% \sim 105\%$ 。在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对偏差应 $\leq 10\%$ 。

10.2 本方法可同时测定尿中1,3-丁二烯另外一种巯基尿酸代谢产物1-(N-乙酰半胱氨酸)-2-羟基-3-丁烯 (MHBMA)。

10.3 尿样 DHBMA 的 LC-MS-MS MRM 见图 1，总离子流图见图 2。

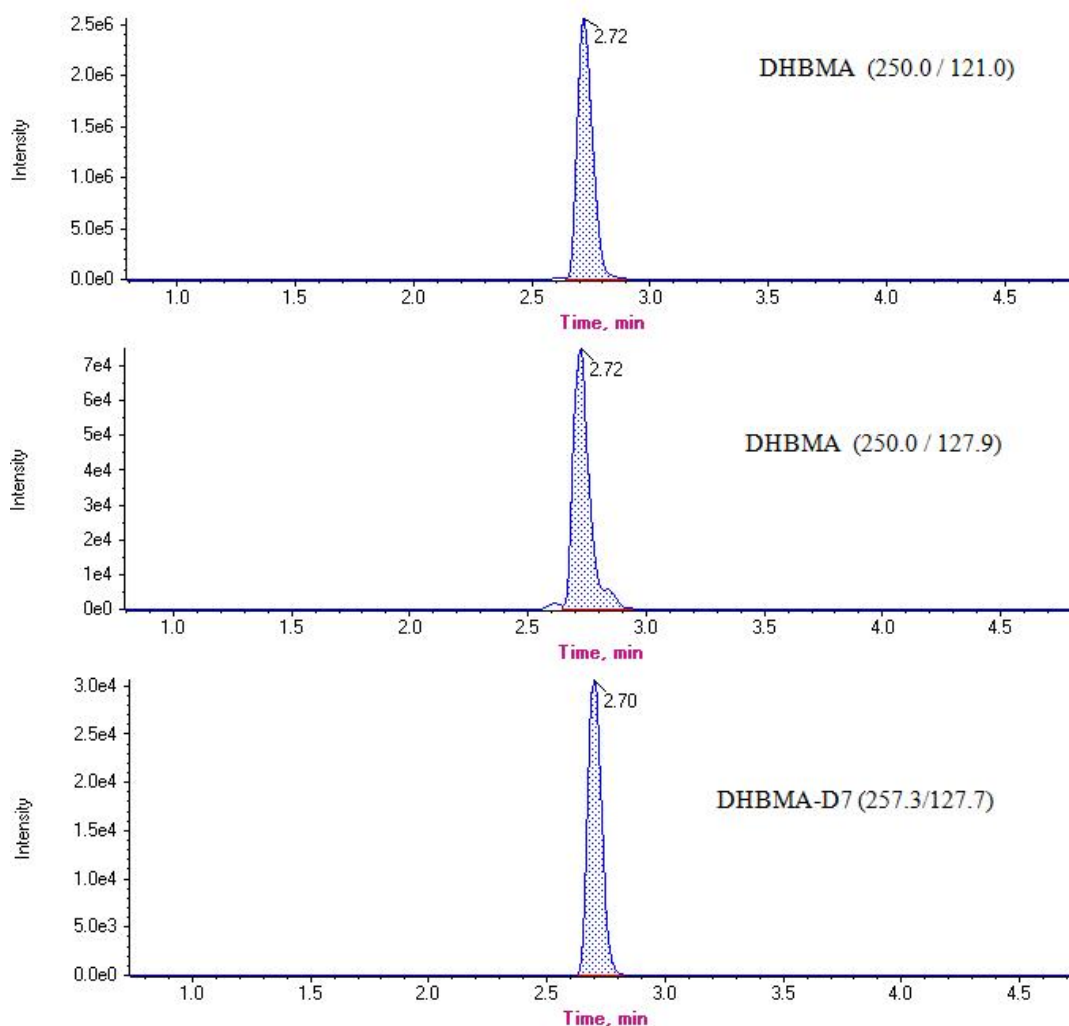


图 1 DHBMA的LC-MS/MS MRM图

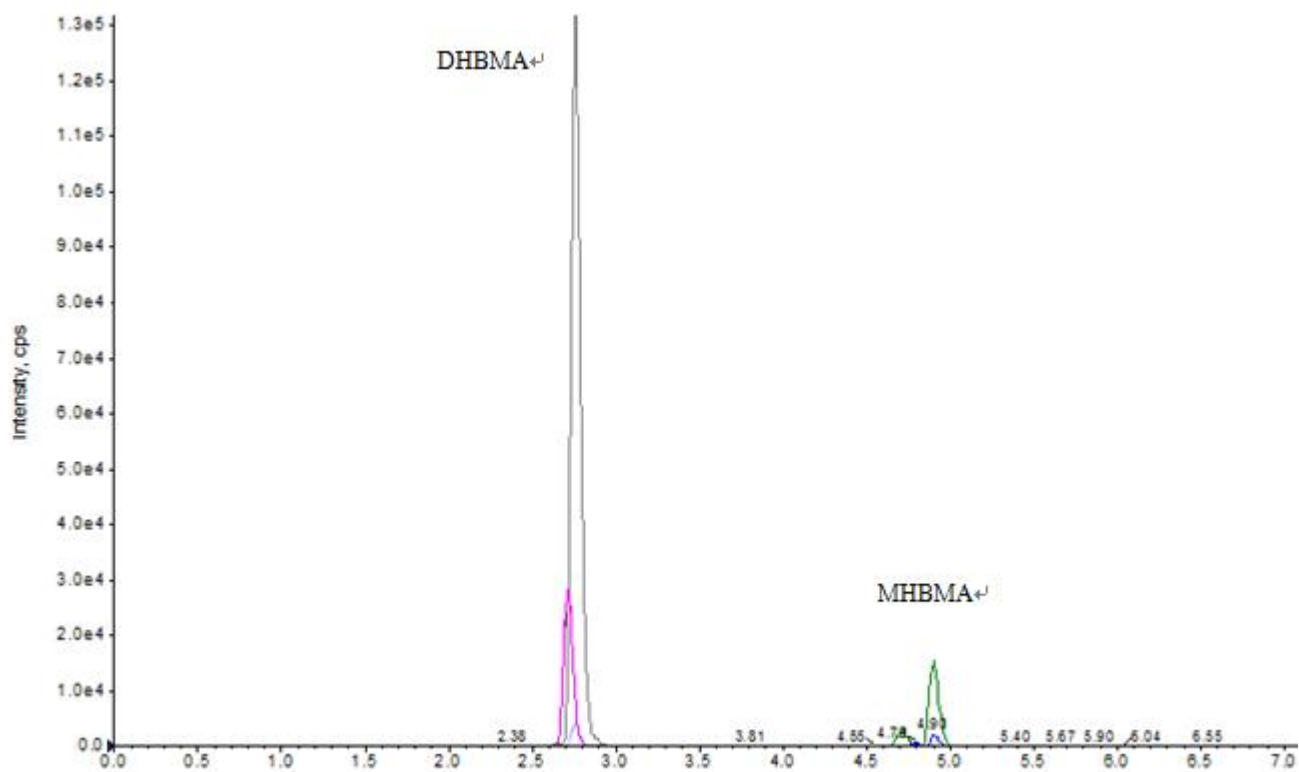


图 2 DHBMA和MHBMA标准溶液的总离子流图