

超高效液相色谱-质谱检测尿液中 马尿酸和甲基马尿酸

杨珍^{1,2}, 李乐¹, 孙边成², 胡聪², 汪琼²

1. 南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 长沙市疾病预防控制中心

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS/MS)检测尿液中马尿酸和甲基马尿酸的新方法。**方法** 实验采用反相 T3 色谱柱, 以乙腈-甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 等度洗脱, 通过电喷雾三重四级杆质谱检测。**结果** 该方法实现了马尿酸和甲基马尿酸的三个同分异构体的基线分离和检测, 方法检出限低(马尿酸 0.07 $\mu\text{g/L}$, 甲基马尿酸 0.1 $\mu\text{g/L}$), 线性范围广(1~10 000 $\mu\text{g/L}$ 均具有良好的线性关系)。**结论** 超高效液相色谱-质谱检测尿液中马尿酸和甲基马尿酸具有较好的应用前景。

关键词: 超高效液相色谱-质谱; 马尿酸; 甲基马尿酸

中图分类号: R446.12 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2018)12-1422-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.12.004

Determination of hippuric acid and methyl hippuric acid in urine by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry

YANG Zhen*, LI Le, SUN Bian-cheng, HU Cong, WANG Qiong

* School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

Corresponding author: LI Le, E-mail: usclile@126.com; SUN Bian-cheng, E-mail: sunbiancheng2013@163.com

Abstract: **Objective** To develop a novel method for the determination of hippuric acid and methyl hippuric acid in urine by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** We employed reversed phase T3 column and acetonitrile-methanol-water (with 0.1% formic acid) as elution solvent, and then detected hippuric acid and methyl hippuric acid in urine by electrospray ionization mass spectrometry. **Results** This method successfully realized the baseline separation and detection of hippuric acid and three isomers of methyl hippuric acid, and obtained low detection limits (0.07 $\mu\text{g/L}$ for hippuric acid and 0.1 $\mu\text{g/L}$ for methyl hippuric acid) and a wide liner range (1-10,000 $\mu\text{g/L}$). **Conclusion** Ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry has a promising application prospect in the determination of hippuric acid and methyl hippuric in urine.

Key words: ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry; hippuric acid; methyl hippuric acid

马尿酸和甲基马尿酸分别是人体接触甲苯、二甲苯后在身体内的代谢产物^[1]。人体长期接触低浓度的甲苯和二甲苯, 容易导致造血系统损害, 不及时治疗, 后期可发展到全血细胞降低、再生障碍性贫血、骨髓增生异常综合症, 甚至白血病。对苯作业场所职工进行定期身体监测是预防甲苯和二甲苯急性和慢性中毒的有效预防措施。而在规定的采样时间内测定甲苯和二甲苯在人体中的代谢产物马尿酸和甲基马尿酸在尿液中的浓度变化, 可以在一定程度上反映作业场所

工人的中毒程度。准确测定马尿酸和甲基马尿酸的含量是职业监护和职业病防治的重要内容, 研究其分析方法, 在临床和职业病防治方面都具有重大意义。根据相关文献可知^[2-7], 液相色谱-质谱可以用来检测马尿酸和甲基马尿酸。本文通过优化色谱和质谱条件, 建立超高效液相色谱-质谱测定尿液中马尿酸、以及三种甲基马尿酸方法, 具有方法检出限低、线性范围广、回收率良好的特点。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱-质谱联用仪(waters 公司, 型号 TQD); 甲酸(Fluka Analytical, for mass spectrometry, -98%); 氨水(Fluka Analytical, eluent additive for LC-MS, >25% in H₂O); 甲醇(Merck

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(21505007)

作者简介: 杨珍(1983-), 男, 研究生, 主管技师, 主要从事理化检验工作。

通信作者: 李乐, E-mail: usclile@126.com; 孙边成, E-mail: sunbiancheng2013@163.com。

KgaA, Lichrosolv Roag. Ph Eur.); 马尿酸 (Toronto Research Chemicals Inc. Purity: 95%); 2-甲基马尿酸 (Toronto Research Chemicals Inc. Purity: 95%); 3-甲基马尿酸 (Toronto Research Chemicals Inc. Purity: 98%); 4-甲基马尿酸 (Toronto Research Chemicals Inc. Purity: 98%); 超纯水; 乙腈 (Merck KgaA, Lichrosolv Roag. Ph Eur.)。

1.2 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC HSS T3 柱, 100 mm×2.1 mm, 粒径 1.8 μm; 柱温: 30 ℃; 进样体积: 1 μl; 液相色谱流动相: A: 0.1% 甲酸水; B: 甲醇; C: 乙腈; 线性等度洗脱条件: 80%A+10%B+10%C; 流速: 0.3 ml/min。

1.3 质谱条件 毛细管电压: 3.2 KV; 电离模式: ESI⁺; 源温度: 150 ℃; 脱溶剂气温度: 350 ℃; 脱溶剂气流量: 650 L/Hr; 反吹气流量: 30 L/Hr; 电子倍增电压: 650 V; 马尿酸和甲基马尿酸质谱条件参数见表 1。

表 1 目标化合物的主要参考质谱参数

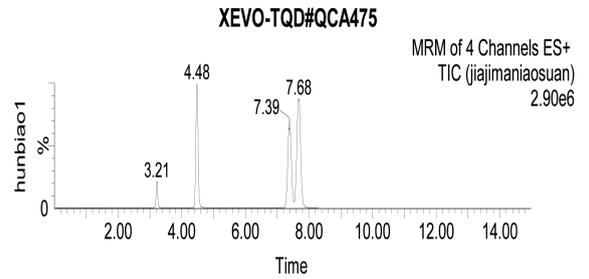
目标化合物	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	碰撞电压 (eV)	定性离子 (m/z)	碰撞电压 (eV)
马尿酸	180.1	105.0	12	77.1	30
1,2-甲基马尿酸	194.2	119.0	15	91.1	30
1,3-甲基马尿酸	194.2	119.0	15	91.1	30
1,4-甲基马尿酸	194.2	119.0	15	91.1	30

1.4 方法 根据 WS/T 53-1996 尿中马尿酸、甲基马尿酸的高效液相色谱测定方法, 取尿样 1.0 ml 置于离心管中, 加入 0.1 ml 盐酸溶液 (1+1), 0.3 g 氯化钠, 4 ml 乙酸乙酯, 于涡旋混合器上混合 1 min, 以 1 000 r/min 速度离心 5 min, 取 0.4 ml 乙酸乙酯于具塞试管中, 至于 70 ℃ 水浴中挥发至干, 加 1 ml 水溶解残留物。取 10 μl 处理好的样品注入色谱仪, 按照 1.2、1.3 条件测定, 以保留时间定性, 峰面积定量。

2 结果

2.1 液相色谱条件选择 本实验以不同比例的 0.1% 甲酸水、乙腈、甲醇作为流动相, 在常规 C18 和 T3 色谱柱上进行马尿酸和甲基马尿酸的分离测试, T3 色谱柱具有更好的分离效果, 色谱图见图 1。在给定的色谱条件下分离马尿酸和甲基马尿酸, 其色谱峰对称性好, 组分能达到基线分离。

2.2 质谱条件选择 在 ESI 正离子模式下, 毛细管电压、碰撞电压、脱溶剂温度和脱溶剂气流量等条件进行了优化筛选, 参数见表 1。按 1.3 质谱条件能获得较好的目标化合物母离子和自离子质荷比。



注: 根据保留时间顺序分别为马尿酸 (保留时间: 3.21 min), 2-甲基马尿酸 (保留时间: 4.48 min), 4-甲基马尿酸 (保留时间: 7.39 min), 3-甲基马尿酸 (保留时间: 7.68 min)。

图 1 马尿酸和甲基马尿酸色谱图

2.3 分析性能 在优化的色谱-质谱参数下, 对四种物质的检出限、线性范围等进行了考察, 结果见表 2。

表 2 分析性能

目标化合物	检出限 (μg/L)	线性范围 (μg/L)	相关系数 (r)	线性范围 (μg/L)	相关系数 (r)
马尿酸	0.07	1~100	0.999 8	100~10 000	0.999 4
1,2-甲基马尿酸	0.1	1~100	0.999 5	100~10 000	0.999 9
1,3-甲基马尿酸	0.1	1~100	0.999 5	100~10 000	0.999 9
1,4-甲基马尿酸	0.1	1~100	0.999 3	100~10 000	0.999 9

2.4 实际样品分析 将方法应用于实际尿样分析, 尿液来自长沙市某工厂工人, 检出浓度分别为马尿酸 736 μg/L, 2-甲基马尿酸 1.60 μg/L, 3-甲基马尿酸 0.92 μg/L, 4-甲基马尿酸 1.83 μg/L。

2.5 回收率实验 为验证方法的准确性, 该实验对实际样品进行了加标, 加标回收率范围为 96.3%~110% 之间, 加标回收率良好。见表 3。

表 3 样品加标回收率

目标化合物	加标 (μg/L)	检出浓度 (μg/L)	回收率 (%)
马尿酸	0	736	0.0
	1 000	1 782	106.0
	2 000	2 756	103.0
1,2-甲基马尿酸	0	1.60	0.0
	2	3.65	103.0
	5	6.54	96.3
1,3-甲基马尿酸	0	0.92	0.0
	2	3.01	110.0
	5	5.96	104.0
1,4-甲基马尿酸	0	1.83	107.0
	2	3.79	97.8
	5	6.87	102.0