

顶空-气相色谱-串联质谱法测定血浆中甲醇含量

唐华民^{1,2}, 傅胜¹, 王安²

1. 中南大学湘雅公共卫生学院, 湖南 长沙 410078; 2. 湖南省职业病防治院, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 建立测定血浆中甲醇含量的顶空-气相色谱-串联质谱法。 **方法** 设计 $L_9(3^4)$ 正交实验对顶空条件进行优化, 样品在选择反应监测模式下检测, 外标法定量。 **结果** 通过正交实验, 确定最优顶空条件为平衡温度 80 ℃、平衡时间 30 min、盐析剂 1.5 g $MgSO_4$ 。该方法的线性范围为 1.0~80 mg/L, 线性方程为 $Y=82\ 670X+45\ 930$, $r=0.9998$, 检出限为 0.2 mg/L, 样品加标回收率为 80.9%~90.5%, 精密密度为 2.7%~3.3%。 **结论** 本方法前处理简单、灵敏、准确, 可用于血浆中甲醇含量的快速检测。

关键词: 甲醇; 顶空-气相色谱-串联质谱; 血浆; 正交实验

中图分类号: R446.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)03-0376-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.03.034

Determination of methanol in plasma by headspace gas chromatography-mass spectrometry

TANG Hua-min^{1,2}, FU Sheng¹, WANG An²

1. Xiangya School of Public Health, Central South University, Changsha, Hunan 410078, China;

2. Hunan Prevention and Treatment Institute for Occupational Diseases, Changsha, Hunan 410005, China

Correspondent author: WANG An, E-mail: walwry@163.com, E-mail: csuwang@csu.edu.cn

Abstract: **Objective** To establish a headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS/MS) method to determine methanol in plasma. **Methods** We designed a $L_9(3^4)$ orthogonal experiment to optimize the process conditions of headspace. Samples were determined in the selected reaction monitoring mode, and external standard method was used in the quantification. **Results** Through the orthogonal experiment, the optimum headspace conditions were determined as follows: equilibrium temperature 80℃, equilibrium time 30 min and salting-out agent 1.5 g $MgSO_4$. The linear range of the method was 1.0 mg/L-80 mg/L. The linear equation was as follows: $Y=82670X+45930$, $r=0.9998$. The detection limit of the method was 0.2 mg/L. The recovery rates ranged from 80.9% to 90.5%, and the precision was between 2.7% and 3.3%. **Conclusions** The sample pre-processing of the established method is simple, sensitive and accurate, and it can be applied to the rapid determination of methanol in plasma.

Key words: methanol; headspace gas chromatography-mass spectrometry; plasma; orthogonal experiment

甲醇可经人体呼吸道、胃肠道和皮肤吸收导致中毒,通常摄入甲醇 5~10 ml 即会中毒,致死量约为 30 ml,我国多地曾发生因饮用甲醇勾兑制成的假酒而导致的急性甲醇中毒事故^[1-3]。急性甲醇中毒可导致中枢神经损害^[4]、视神经损害^[5]和代谢性酸中毒^[6],严重者抽搐、昏迷、死亡等。生物材料中有害因素常见的检测方法有比色法^[7]、气相色谱法^[8]、液相色谱-质谱法^[9]等。顶空法前处理简单,可减少高沸点或非挥发物质对色谱柱的污染,同时能避免基体中复杂成份的干扰。本文利用正交实验优化了顶空的适宜条件,

对方法的精密密度、准确度和灵敏度进行评价,建立了一种顶空-气相色谱-串联质谱法用于快速测定血浆中的甲醇含量,有助于甲醇中毒的诊断和救治^[10]。

1 仪器与试剂

1.1 Trace 1300-TSQ9000 三重四级杆气质联用仪(Thermo Fisher);恒温水浴箱;振荡器;4 ml 顶空瓶;甲醇(HPLC 级,Merck 公司);无水 Na_2SO_4 (优级纯,阿拉丁)、NaCl(优级纯,阿拉丁)、无水 $MgSO_4$ (优级纯,阿拉丁)。

1.2 标准系列配制 称取甲醇标准品 50 mg 于 25 ml 容量瓶中,用水定容配制成 2 000 mg/L 标准储备液。用水稀释至浓度为 1.0、5、10、20、40、80 mg/L 的标准工作溶液。

作者简介:唐华民(1991-),男,在读研究生,技师,主要从事理化检验工作。

通信作者:王安, E-mail: walwry@163.com; csuwang@csu.edu.cn。

1.3 样品前处理 吸取 1.00 ml 血浆或标准溶液于 4 ml 顶空瓶中,加入盐析剂,混匀,一定温度和时间平衡后,手动顶空进样 0.5 ml。

1.4 色谱条件 色谱柱: TG-1MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 柱温: 初始温度 40 ℃, 保持 1 min, 以 10 ℃/min 升至 280 ℃, 保持 20 min; 载气为氦气, 纯度大于 99.999%; 柱流量 1.2 ml/min, 进样口温度 300 ℃, 分流比 10:1。

1.5 质谱条件 传输线温度 250 ℃, 离子源温度 280 ℃, 离子源为电子轰击 (EI) 离子源, Q2 碰撞气为高纯氩气。采用选择反应监测 (selective reaction monitoring, SRM) 模式扫描, 以质核比 m/z 31→29 为定量离子, m/z 32→31 为定性离子, 碰撞电压分别为 10 eV 和 5 eV。

2 结果

2.1 一级质谱条件优化 选择离子检测 (single ion monitoring, SIM) 模式下, 选择 m/z 20~200 对顶空气进行全扫, 甲醇保留时间为 1.52 min, 空气峰保留时间为 1.34~1.61 min, 在甲醇峰处存在空气中的大量的 m/z 32 离子和 m/z 29 离子干扰, 无法对甲醇进行定性和定量。

2.2 二级质谱条件优化 根据甲醇保留时间, 选择 m/z 和相对丰度较大的一级离子作为母离子, 考察不同碰撞电压下产生的子离子, 选择丰度较高的子离子以及相应的碰撞诱导裂解电压建立 SRM 方法, 参数见表 1。

表 1 甲醇的 SRM 质谱条件

化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞电压 (eV)
甲醇	31	29	10
	32	31	5
	29	28	40

采用 SRM 模式, 选择 m/z 31→29 为定量离子, m/z 32→31 为定性离子, 获得 SRM 模式下甲醇提取离子流图, 见图 1。

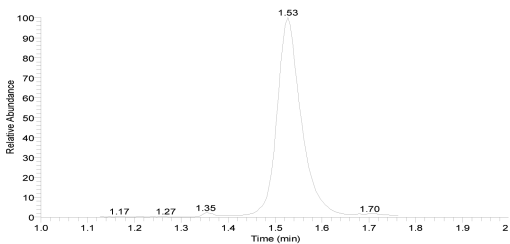


图 1 SRM 模式甲醇提取离子流图

2.3 顶空条件优化

2.3.1 配制 80 mg/L 的甲醇溶液进行条件测试。

2.3.2 平衡温度 顶空气中甲醇浓度与顶空瓶中甲醇的气体分压成正比, 温度升高, 甲醇蒸汽压增加, 顶空气中甲醇浓度增大。温度过低, 平衡所需时间长; 温度过高, 样品的重现性降低。考察平衡温度为 40 ℃~90 ℃ 时对 m/z 31→29 峰面积的影响。结果显示, 峰面积随着温度的升高而增大, 综合考虑, 选择 60 ℃~80 ℃ 作为平衡温度范围。

2.3.3 平衡时间 考察平衡时间在 10~60 min 范围内时峰面积的变化, 结果显示, 40 min 后峰面积变化趋于稳定, 达到平衡状态, 故选择 20~40 min 为平衡时间范围。

2.3.4 盐析剂 盐析效应是指溶液中加入无机盐类使某种物质溶解度降低而析出的过程。通过查阅文献, 选择盐析剂无水 Na₂SO₄、NaCl 和无水 MgSO₄, 选择 0.5~1.5 g 作为盐析剂质量范围。

2.3.5 正交实验 根据单因素实验的结果分析, 本实验选择四因素三水平正交实验表 L₉(3⁴), 其影响因素和水平见表 2, 以甲醇峰面积为指标综合考虑选择最优顶空条件。

表 2 实验的因素和水平

水平	A 平衡温度 (℃)	B 平衡时间 (min)	C 盐析剂	D 盐析剂质量 (g)
1	60	20	MgSO ₄	0.5
2	70	30	NaCl	1.0
3	80	40	Na ₂ SO ₄	1.5

正交设计的 9 次实验结果如表 3 所示。利用 SPSS 22.0 软件对结果进行方差分析。

表 3 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	峰面积 (×10 ⁶)
1	1	1	1	1	3.085
2	1	2	2	2	2.448
3	1	3	3	3	2.838
4	2	1	2	3	4.027
5	2	2	3	1	4.348
6	2	3	1	2	4.662
7	3	1	3	2	4.764
8	3	2	1	3	5.429
9	3	3	2	1	4.651
K1	2.790	3.959	4.392	4.028	
K2	4.346	4.075	3.709	3.958	
K3	4.948	4.050	3.983	4.098	
R	2.158	0.116	0.686	0.140	

利用 SPSS 22.0 软件, 以均方值最小的 B 因素作

为误差项来计算方差,结果见表 4。

表 4 SPSS 方差分析数据表

源	Ⅲ型平方和	df	均方	F 值	P 值
模型	8. 176a	6	1. 363	120. 889	0. 008
A	7. 437	2	3. 719	329. 896	0. 003
C	0. 709	2	0. 355	31. 466	0. 031
D	0. 029	2	0. 015	1. 304	0. 434
误差	0. 023	2	0. 011		
总计	154. 222	9			
校正的总计	8. 199	8			

从表 4 中可以看出, $P(A)$ 、 $P(C)<0.05$,即平衡温度和盐析剂类型对提高峰面积有显著影响。结合表 3 中极差 $RA>RC>RD>RB$,可以得出 4 个影响因素主次为 ACDB,再由 $K1K2K3$,得到最佳顶空条件为 $A_3C_1D_3B_2$,即平衡温度 80℃,平衡时间 30 min,盐析剂为 $MgSO_4$,盐析剂质量为 1.5 g。

2.4 基质效应、线性范围和检出限 采用标准曲线斜率比值的方法评价基质效应情况,分别配制不同浓度的基质标准工作液和溶剂标准工作液,以 m/z 31→29 峰面积对甲醇的质量浓度作线性回归,绘制标准曲线,计算曲线斜率的比值,本方法基质效应为 92.4%,一般认为比值在 0.85~1.15 之间基质效应不明显,因此本文采用蒸馏水配制标准曲线。

在 1.0~80 mg/L 的范围内,回归方程为 $Y=82\ 670X+45\ 930$, $r=0.9998$,具有良好的线性关系。参考 GB/T 27417-2017 的要求,采用信噪比法,用空白血样为基质,添加不同量的甲醇标准溶液后,按照以信噪比(S/N) ≥ 3 确定方法的检出限,本方法中甲醇的检出限为 0.2 mg/L。

2.5 精密度和加标回收实验 配制 9.9 和 39.6 mg/L 的高低 2 个水平的加标血样,每个水平加标血样各取 6 份,以所建方法进行检测,计算回收率和精密度,结果见表 5。方法的回收率为 80.9%~90.5%,相对标准偏差为 2.7%~3.3%,满足分析的要求。

表 5 方法回收率和精密度($n=6$)

添加水平(mg/L)	本底值	测定平均值(mg/L)	加标回收率(%)	相对标准偏差(%)
9.9	未检出	8.6	83.1~90.5	3.3
39.6	未检出	32.9	80.9~86.9	2.7

2.6 实际样品检测 某地发生疑似饮用假酒导致的中毒事件,采集 5 名疑似中毒病人的血液,用所建立的方法检测,检测结果如表 6 所示。

表 6 疑似中毒病人血浆中甲醇含量检测结果

编号	1	2	3	4	5
血浆中甲醇含量 mg/L	6.5	5.4	10.9	41.8	21.2

5 名疑似中毒病人血浆中甲醇含量的检测结果均在线性范围内,为 5.4~41.8 mg/L,检测结果与临床诊断结果相互印证。

3 讨论

顶空法具有前处理简便、耗时短、干扰少等优点,气相色谱-串联质谱仪灵敏度高和特异性好,本方法结合两者的优点,建立顶空-气相色谱-串联质谱法检测血浆中的甲醇。甲醇和空气峰保留时间相近,须使用特定色谱柱才能将甲醇峰和空气峰分开,且空气峰面积远远大于甲醇峰面积,对甲醇干扰大。本文采用 SRM 模式,以 m/z 31→29 和 m/z 32→31 为特征离子建立的质谱方法,使用常规色谱柱即可排除空气峰干扰,对甲醇特异性高。本文利用正交实验考察多因素对甲醇峰面积的影响,从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验,实现了以最少的试验次数达到与大量全面试验等效的结果,以高效、快捷、经济的方式得到最优顶空条件。采用优化后条件对该方法进行验证,实验结果显示,该方法基质效应不明显,灵敏度、回收率和精密度均满足分析要求,应用于实际样品的检测取得满意结果,适合于血浆中甲醇含量的快速检测,并有望为甲醇中毒的临床诊断提供依据。

参考文献

[1] 姜贤德,徐殿炜,师庆柱. 急性甲醇中毒病例报告 1 例[J]. 职业卫生与应急救援,2018,36(3):270-271.

[2] 熊盟,罗艳,唐中建. 重度急性甲醇中毒 2 例[J]. 广东医学,2018,39(S2):336.

[3] Pearson J, Saady JJ, Fierro M, et al. An unusual case of homicide by chronic methanol poisoning [J]. Forensic Toxicol, 2012, 30(1):66-69.

[4] Choi JH, Lee SK, Gil YE, et al. Neurological complications resulting from non-oral occupational methanol poisoning[J]. J Korean Med Sci, 2017, 32(2):371-376.

[5] 马中华,江汉秋,张晓君. 吸入性甲醇中毒致严重视力损害临床分析[J]. 中国眼耳鼻喉科杂志,2013,13(4):219-221.

[6] 谢伟峰,曲彦,胡丹. 急性甲醇中毒致严重代谢性酸中毒 1 例报告[J]. 吉林医学,2013,34(35):7563-7563.

[7] 谢广明,潘叫全,刘泽春. 人体组织和血液中残留甲醇检测方法探讨[J]. 公共卫生与预防医学,2010,21(3):83.

[8] 庄小舟,叶立和,彭建梅,等. 唾液中氟离子的五氟苯基溴衍生气相色谱法测定[J]. 实用预防医学,2018,25(8):918-921.

[9] 杨珍,李乐,孙边成,等. 超高效液相色谱-质谱检测尿液中马尿酸和甲基马尿酸[J]. 实用预防医学,2018,25(12):1422-1424.

[10] Barceloux DG, Bond GR, Krenzelok EP, et al. American academy of clinical toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 2002, 40(4):415-446.