

【化学测定方法】

GC/MS同时检测人尿中 N,N-二甲基乙酰胺及其代谢产物 N-甲基乙酰胺

李峰, 洪萍, 应杏秋

(浙江省杭州市萧山区疾病预防控制中心, 杭州 311201)

[摘要] 目的: 探讨利用气相色谱-质谱(GC/MS)建立一种准确可靠的尿样中的 N,N-二甲基乙酰胺(DMAC)及其代谢产物 N-甲基乙酰胺(NMAC)的测定方法。方法: 尿样经乙酸乙酯萃取、浓缩后, 用 GC/MS全扫描模式(scan)进行定性分析, 确定组分出峰时间和特征质量离子, DMAC选择 15, 44, 87 m/z; NMAC选择 30, 43, 73 m/z 进行选择离子扫描(SM), 作定量分析。结果: DMAC和 NMAC的线性范围分别为 0.1 mg/L~10.0 mg/L和 0.5 mg/L~10.0 mg/L; 相关系数分别为 0.9993和 0.9991; 最低检出限分别为 0.02 mg/L和 0.10 mg/L; 相对标准偏差分别为 3.26%和 7.22%; 样品加标回收率分别为 91%~99%和 88%~102%。结论: 方法准确性好、灵敏度高、干扰少, 是检测尿样中 DMAC和 NMAC的较好方法。

[关键词] N,N-二甲基乙酰胺; N-甲基乙酰胺; 尿样; GC/MS

[中图分类号] O657.63

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2011)02-0304-03

Determination of N,N-Dimethylacetamide and its metabolite N-Methylacetamide in human urine by GC/MS

LI Feng, HONG Ping, YING Xing-qiu

(Xiaoshan Disease Control and Prevention Center Hangzhou 311201, China)

[Abstract] **Objective** To develop an accurate reliable method to determine N,N-Dimethylacetamide(DMAC) and its metabolite N-Methylacetamide(NMAC) in human urine by GC/MS. **Methods** The urine was extracted and concentrated with ethyl acetate firstly, and then qualitatively analyzed by GC/MS full scan mode to determine the retention time and characteristic mass ions and quantitatively analyzed in selective ion monitoring with ions at m/z 15, 44, 87 for DMAC and m/z 30, 43, 73 for NMAC. **Results** The calibration curves of DMAC and NMAC were linearly in the range of 0.1 to 10.0 mg/L (correlation coefficient was 0.9993) and 0.5 to 10.0 mg/L (correlation coefficient was 0.9991), respectively. The detection limits, relative standard deviations, recovery ranges for DMAC and NMAC were 0.02 mg/L and 0.10 mg/L, 3.26% and 7.22%, 91% to 99% and 88% to 102%, respectively. **Conclusion** This method had high accuracy, high sensitivity and low interference. It could be applied to determine DMAC and NMAC in human urine.

[Key words] N,N-Dimethylacetamide; N-Methylacetamide; Urine; GC/MS

二甲基乙酰胺(N,N-Dimethylacetamide, DMAC)是近年来使用量剧增的良好溶剂, 广泛用于石油加工和有机合成工业, 如耐热纤维、塑料薄膜、涂料、医药、催化剂和丙烯酸纺丝等工业^[1]。与同系的二甲基甲酰胺相比, 其热稳定性、水解稳定性高, 腐蚀性和毒性小, 可代替二甲基甲酰胺。DMAC对职业接触工人也可造成健康损害, 工人长期接触较高浓度 DMAC主要表现为肝脏损害, 上呼吸道黏膜刺激症并伴随类神经衰弱症等^[2]。1994年, Marino等人对一起 DMAC事故中接触工人进行调查, 发现工人有不同程度的肝炎, 精神错乱, 幻觉, 皮肤灼伤, 蜂窝织炎, 双侧结膜炎, 横纹肌溶解或者凝血障碍^[3]。1997年 Baum等的研究中, 接触工人也发生肝中毒^[4]。世界各国相继制定了 DMAC车间空气卫生标准, 如美国为 10 ppm(TWA)。我国现行国家标准 GBZ2-2002规定工作场所职业

接触限值: PC-TWA为 20 mg/m³, PC-STEL为 40 mg/m³^[5]。DMAC沸点较高, 在室温下不易挥发, 人体皮肤对其有很大的吸收作用, 职业接触工人工作时经口、经皮肤往往同时接触, DMAC通过皮肤吸收进入体内与经呼吸道吸收进入体内具有同等的生物学作用, 采用单一的测定车间空气浓度很难说明 DMAC职业接触工人的实际接触水平, 而应通过生物监测来评价职业接触工人 DMAC实际接触程度。N-甲基乙酰胺(N-Methylacetamide, NMAC)是二甲基乙酰胺在人体内代谢后的代谢物^[6]。因此, 通过监测尿中的 NMAC含量, 进而评价职业接触者 DMAC的总摄入量是非常有意义的。但是到目前为止, 国内外都还没有开展相关的研究。本文采用溶剂萃取尿样, 浓缩后用气相色谱质谱联用仪测定, 方法准确性好、灵敏度高、干扰少, 取得满意结果, 现将方法报告如下。

[基金项目] 浙江省杭州市萧山区科技计划(2009502)

[作者简介] 李峰(1975-), 男, 本科, 主管检验师, 主要从事化学毒物分析工作。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Agilent 6890N GC/5975B MS气质联用仪(美国

安捷伦公司), Innowax 弹性石英毛细管柱 (30 m × 250 μm × 0.25 μm); 离心机等。

1.1.2 试剂 N,N-二甲基乙酰胺、N-甲基乙酰胺、乙酸乙酯均为色谱纯,氯化钠为分析纯。

1.2 实验条件

1.2.1 色谱 脉冲不分流进样,进样口温度 160°C;恒流 1.0 ml/min 程序升温,初温 60°C,保持 1 min 以 10°C/min 升温至 260°C,保持 5 min。

1.2.2 质谱 离子源温度 230°C;EI源,电压为 70eV;选择离子扫描(SM)DMAC选 15, 44, 87m/z NMAC选 30, 43, 73m/z。

1.3 实验步骤

1.3.1 样品的处理 采集接触 DMAC 工人班末尿 50 ml 混匀后尽快测定尿比重。于低温冰箱冷冻结冰,然后常温下解冻,离心。吸取离心后尿样 10 ml 加入 2.5 g NaCl 加入 0.5 ml 1 mol/L HCl 加入 5 ml 乙酸乙酯萃取,充分振摇,离心后分离乙酸乙酯层,再加入 5 ml 乙酸乙酯萃取,合并两次萃取的乙酸乙酯,用 N₂ 浓缩至 1.0 ml 进样 1 μl 分析。

1.3.2 DMAC 和 NMAC 工作曲线的配制,准确吸取 1.0 ml DMAC 和 NMAC,加入 100 ml 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,此液为标准贮备液。然后将标准贮备液稀释成 0.1 μg/ml, 0.5 μg/ml, 1.0 μg/ml, 2.0 μg/ml, 5.0 μg/ml, 10.0 μg/ml 用空白尿样定容,按样品处理方法进行尿样萃取,进 1 μl 分析,以峰面积绘制工作曲线。

1.3.3 计算 $C = c \cdot v \cdot K / V$

C-尿中 DMAC 和 NMAC 的浓度, mg/L;

c-由工作曲线上查得的 DMAC 和 NMAC 的浓度, μg/ml

v-样品萃取后乙酸乙酯的最后体积, ml

V-取尿样体积, ml

K-尿样比重校正系数。

2 结果与讨论

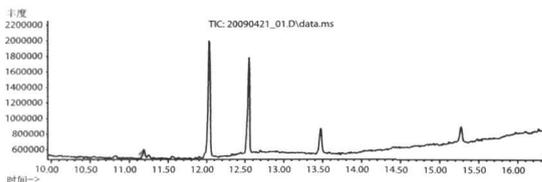
2.1 色谱柱的选择

对于本实验,色谱柱的选择是关键点,本试验使用了 HP-5MS 柱、DB-1701 柱和 Innowax 柱,发现 HP-5MS 柱上 DMAC 和 NMAC 出峰时间在 3 min ~ 5 min 左右,与溶剂混在一起出峰,而且尿中 DMAC 和 NMAC 含量较低时不能出峰,因为尿液中的杂质在这个时间段对 DMAC 和 NMAC 的出峰也影响较大,无法进行定性定量分析。DB-1701 柱上 DMAC 和 NMAC 不出峰。DMAC 和 NMAC 在 Innowax 柱上出峰时间分别为 12.05 min 和 12.53 min, 较为理想。

2.2 质谱测定

2.2.1 定性测定 全扫描方式(scan)是对所定义的质量范围(20 amu ~ 300 amu)进行采集,然后再对所得到的总离子流图进行谱库检索,定量分析以确定组分的保留时间和特征离子。

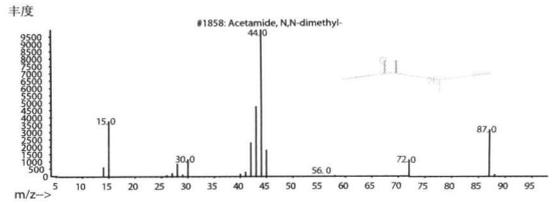
Scan 模式尿样萃取液的总离子流图。



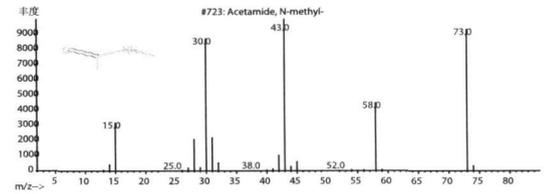
2.2.2 定量测定 用选择离子扫描模式(SM)选择几个特定

的质量峰进行扫描,这样每个离子检测的时间就相对较长,灵敏度、准确度都有很大提高。DMAC 选择离子选 15, 44, 87m/z NMAC 选择离子选 30, 43, 73m/z。

DMAC 的质谱图



NMAC 的质谱图



2.3 方法的线性范围及检出限

DMAC 和 NMAC 的线性范围分别为 0.1 mg/L ~ 10.0 mg/L 和 0.5 mg/L ~ 10.0 mg/L; 相关系数分别为 0.9993 和 0.9991; 方法检出限的计算采用 10 倍信噪比(S/N 值)为检出限,本次实验测得分别为 0.02 mg/L 和 0.10 mg/L;

2.4 方法的精密度

以浓度为 1.0 μg/ml 的 DMAC 和 NMAC 重复测定 4 次,计算相对标准偏差,分别为 3.26% 和 7.22%, 见表 1。

表 1 DMAC 和 NMAC 的方法精密度

	浓度 (μg/ml)	峰面积均值	SD	CV(%)
DMAC	1.0	13727383	447412.5	3.26
NMAC	1.0	3008243	217257	7.22

2.5 方法的回收率试验

10 ml 正常人尿样中(空白尿样)加入 100.0 μg/ml 浓度的 DMAC 和 NMAC 标准溶液 0.2 ml, 0.5 ml, 1.0 ml 进行检测,结果加标回收率分别为 91.0% ~ 98.8% 和 88.0% ~ 101.4%, 说明该方法结果稳定、准确,测定结果见表 2。

表 2 DMAC 和 NMAC 的方法回收率

加入浓度 (mg/L)	DMAC 测得浓度 (mg/L)	DMAC 回收率 (%)	NMAC 测得浓度 (mg/L)	NMAC 回收率 (%)
2.0	1.82	91.0	1.76	88.0
5.0	4.94	98.8	5.07	101.4
10.0	9.65	96.5	9.89	98.9

2.6 去除干扰的方法

本文通过以下 3 个方法,使尿基质对样品测定干扰减少到最小: ①新采集尿样中含有许多杂质,应先将尿样于冰箱内冷冻,然后离心、萃取测定,通过这样一个步骤,可以使尿样中的杂质和尿液较好的分离,减少干扰。②利用选择离子模式选择特征离子测定,特异性强,可以减少其它尿基质对样品测

(下转第 308 页)

120 μ l 的纯甲醇溶液, 漩涡 2 min 12000 rpm 离心 5 min 取上清液 100 μ l 加入 100 μ l 对照品加内标的水溶液, 最终浓度与质控样品最终浓度相当, 混匀后进样, 记录对照品与内标的峰面积比值。一份来源的空白血浆配制低、中、高 3 个浓度, 每个浓度配制 3 份。结果表明: 6 份不同的空白基质并且 9 个浓度的样品峰面积比值与质控样品峰面积比值的 *RSD* 为 7.8%。结果表明, 本实验的色谱和质谱条件可有效避免不同来源血浆的基质效应。

2.8 定量限与检测限

信号大小等于噪音 3 倍时的 6,7-二甲氧基香豆素的量, 由计算得出血浆中最低检测限约为 0.1 ng/ml, 血浆中最低定量限为 0.5 ng/ml (*S/N* > 10)。

3 讨论

3.1 血浆样品预处理方法的选择

首先考察了乙酸乙酯提取法和甲醇蛋白沉淀法, 计算两种方法的提取回收率, 均在 60% ~ 90%, 两种提取方法都很稳定。由于蛋白沉淀法操作简便, 适合于大量生物样品前处理, 因此本试验中选择了用直接沉淀蛋白法。

3.2 溶剂中的稳定性

6,7-二甲氧基香豆素及香豆素的 HPLC-DAD 分析方法已有报道, 但未对对照品溶液及内标溶液在甲醇溶剂中的避光及自然光下保存的稳定性进行考察, 研究结果表明: 在避光和自然光条件下, 6,7-二甲氧基香豆素及香豆素在甲醇溶剂中保存三十天内非常稳定, 为以后的分析方法确定奠定了基础。

3.3 色谱柱的选择

本文对柱长、粒径、内径都相同 C8、C18 两种色谱柱进行了考察, 结果显示 C8 得到的色谱峰响应更高, 且峰宽更窄。

3.4 流动相组成的选择

实验过程中考察了水相中不同比例的甲酸对对照品溶液响应的影响, 其中包括 0.025% 甲酸 - 10 mM 甲酸铵、0.1% 甲

酸 - 10 mM 甲酸铵、0.2% 甲酸 - 10 mM 甲酸铵, 从色谱图可知, 甲酸比例的增加有助于提高色谱峰的响应, 当甲酸比例增加至 0.2% 时, 色谱峰响应与前者相比, 没有明显变化, 故确定选择 0.1% 甲酸 - 10 mM 甲酸铵作为水相。之后又对甲醇、乙腈进行了比较, 结果显示, 甲醇作为有机相得到的色谱峰雾化效果较好。

[参考文献]

- [1] 李陪生, 刘渡舟, 汉, 张仲景. 伤寒论 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 328-330.
- [2] Huang HC, Huang YL, Chang JH, *et al*. Possible mechanism of immunosuppressive effect of scopolamine (6,7-dimethoxycoumarin) [J]. *Eur J Pharmacol* 1992; 217(2-3): 143-148.
- [3] Huang HC, Lee CR, Weng YI, *et al*. Vasodilator effect of scopolamine (6,7-dimethoxycoumarin) from a Chinese herb [J]. *Eur J Pharmacol* 1992; 218(1): 123-128.
- [4] J Yamahara, G Kobayashi, H Matsuda, *et al*. The effect of scopolamine, a coumarin derivative isolated from the Chinese crude drug *Atropa belladonna* Capillaris Flos, on the heart [J]. *Chem Pharm Bull* 1989; 37(5): 1297-1299.
- [5] Shama ML. Mechanism of hypotensive action of scopolamine [J]. *Indian J Med Res* 1988; 87: 387-394.
- [6] Tsai TH, Kuo KW, Cheng FC, *et al*. Determination of scopolamine in rat plasma by liquid chromatography and application to pharmacokinetics [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 1996; 19(7): 2649-2651.
- [7] 王倩, 于治国, 李柯. 反相高效液相色谱法测定大鼠血浆中 6,7-二甲氧基香豆素含量及其在药代动力学中的应用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2002; 11(5): 272-274.
- [8] 季红, 王沛, 于治国, 等. 6,7-二甲氧基香豆素在大鼠体内主要代谢产物的研究 [J]. *长春中医药大学学报*, 2006; 22(3): 40-41.
- [9] 钟大放. 以最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题 [J]. *药物分析杂志*, 1996; 16(5): 343-346.

(收稿日期: 2010-11-30)

(上接第 305 页)

定的干扰。③选择合适的色谱柱 Innova 柱, 使 DMAC 和 NMAC 出峰时间尽量延后, 可以与很多干扰物质的出峰分开, 从而进行更好的定性定量分析。

2.7 实际样品测定

测定了 DMAC 接触工人尿样 58 例, 尿中 DMAC 和 NMAC 的结果均在 0 mg/L ~ 28 mg/L 之间, 测定结果与工人现场接触的情况相符。

3 小结

本文所建立的 GC-MS 同时对 DMAC 和 NMAC 测定的方法, 方法的检出限、回收率和精密度均符合方法学的要求, DMAC 及 NMAC 的出峰时间分别为 12.05 min 和 12.53 min, 大大减少了溶剂与样品基质对检测的影响, 而且灵敏度较高, 适合对 DMAC 接触人群尿样中 DMAC 和 NMAC 的测定。

[参考文献]

- [1] 范金歧. 二甲苯酰胺市场调研报告 [J]. *化工科技市场*, 2004; 2

28-30.

- [2] 江朝强. 有机溶剂中毒预防指南 [M]. 化学工业出版社, 2006: 487.
- [3] Marino G, Anastopoulos H, Woolf AD. Toxicity associated with severe inhalational and dermal exposure to dimethylacetamide and 1,2-ethanediamine [J]. *J Occup Med*, 1994; 36(6): 637-641.
- [4] Baum SL, Sundaa J. Toxic hepatitis from dimethylacetamide [J]. *Int J Occup Environ Health*, 1997; 3(1): 1-4.
- [5] GBZ2-2002. 中华人民共和国卫生部. 工作场所有害因素职业接触限值 [S]. 2002.
- [6] L Perbellini A, Principalle M, Caivano *et al*. Biological monitoring of occupational exposure to N,N-dimethylacetamide with identification of a new metabolite [M]. *J Occup Environ Med* 2003; 60(10): 746-751.

(收稿日期: 2010-11-23)