文章编号：1006-3617(2010)07-0418-04　　中图分类号：R134　　文献标志码：A

【方法研究】

高效液相色谱与液质联用测定尿中苯巯基尿酸的方法比较

相红，梅勇*，宋世震，陈思琦，叶玉杰，叶方立

摘要：［目的］通过高效液相色谱（HPLC）与液质联用（LC/MS）检测尿中苯巯基尿酸（SPMA）的方法比对，评价HPLC方法的可行性。［方法］尿样经50%硫酸酸化、氯仿：异丙醇（体积比为5：1）萃取，挥干残渣用甲醇溶解后经十八烷基硅烷（ODS）柱分离，分别采用紫外检测器和质谱检测器检测；对86名职业苯接触者尿样采用两种方法比对分析，以LC/MS分析数据评定HPLC测定结果的有效性。［结果］HPLC方法和LC/MS方法对SPMA的检出限（LOD）分别为40 μg/L和10 μg/L，SPMA保留时间分别为31 min和7.8 min左右。86份尿样中有13份为假阳性，两方法检测结果的相关系数为0.915，但HPLC检测数据高估LC/MS数据8%~21%。［结论］HPLC法可作为职业苯接触者生物监测的初步筛检方法，LC/MS可准确定量测定尿中SPMA浓度。

关键词：高效液相色谱；液质联用；苯；苯巯基尿酸

Determination of Urinary S-phenylmercapturic Acid by HPLC and LC/MS: A Comparison of the Two Methods

XIANG Hong, *MEI Yong**, *SONG Shi-zhen*, *CHEN Si-qi*, *YE Yu-jie*, *YE Fang-li*（*Department of Occupational Health*, *Medical College*, *Wuhan University of Science and Technology*, *Wuhan*, *Hubei* 430065, *China*）. **Address correspondence to MEI Yong*; *E-mail: meiyong 2006@163.com*

Abstract:［Objective］To compare the validity of HPLC and LC/MS analysis of urinary S-phenylmercapturic acid（SPMA）so as to assess the feasibility of HPLC method in measuring SPMA.［Methods］The urine samples were acidified by 50% sulfuric acid and pretreated by liquid-liquid extraction using chloroform：isopropyl alcohol（5：1, v/v）. The residue dissolved with methanol was injected in ODS-3 column for SPMA separation, followed by ultraviolet detector and LC/ESI-NI/MS analysis, respectively. Paired measurements were applied to the analysis of 86 urine samples from workers occupationally exposed to benzene. HPLC results were evaluated by comparison with the LC/MS analysis.［Results］The limits of detection of HPLC and LC/MS were 40 μg/L and 5 μg/L, respectively. Retention time of SPMA peak appear at about 31 min and 7.8 min, respectively. 13 of 86 samples in HPLC analysis were assigned as false-positives. HPLC results compared with LC/MS data showed to overestimate SPMA concentrations of about 8%-21% and a correlation coefficient of 0.915 was calculated between the two methods.［Conclusion］HPLC analytical method is suitable for preliminary screening of urinary SPMA in routine biomonitoring for benzene-exposed workers, while LC/MS could be an more accurate quantitative determination method for measuring urinary SPMA concentration.

Key Words: high performance liquid chromatography(HPLC); liquid chromatography-mass spectrometry(LC/MS); benzene; S-phenylmercapturic acid(SPMA)

苯是石化工业的副产品，国际癌症组织（IARC）确认苯为人类致癌物，我国工作场所空气中苯的时间加权平均容许浓度（PC-TWA）为6 mg/m^3，短时间接触容许浓度（PC-STEL）为10 mg/m^3。近年来国外学者对苯接触的生物标志物作了大量研究，发现尿中苯代谢产物苯巯基尿酸（SPMA）是低浓度苯接触敏感和特异的指标[1]，且非侵入性采集尿样也适合于群体生物监测，因而美、德等国家将其列为苯接触生物检测指标并制定了相应的生物限值。然而，尿中SPMA排出量仅占吸收苯剂量的0.005%~0.3%[2]，国内外多采用液质联用（LC/MS）和气质联用（GC/MS）检测方法，虽然其准确度和灵敏度高，但因仪器价格昂贵增加了检测成本，限制了此项指标在我国推广应用。高效液相色谱（HPLC）仪器在我国正逐步普及，日本学者INOUE曾应用HPLC检测尿中SPMA[3-4]，本研究拟参照其样品前处理方法，应用HPLC和LC/MS两种仪器检测尿中SPMA，以评价HPLC方法检测尿中SPMA的可行性。

［作者简介］相红（1983-），女，硕士生，研究方向：生物监测技术；E-mail：xianghong1984@163.com

［*通信作者］梅勇副教授；E-mail：meiyong 2006@163.com

［作者单位］武汉科技大学医学院劳动卫生教研室，湖北 武汉 430065

1 材料与方法

1.1 化学试剂

苯巯基尿酸（$C_{11}H_{13}NO_3S$，纯度≥99%）购自Tokyo Kasei Kogyo公司、肌酐（$C_4H_7N_3O$，CAS：60-27-5，纯度＞99%）购自Sigma-Aldrich公司。甲醇（纯度≥99.8%）、乙腈（纯度≥99%）为色谱纯，三氯甲烷（纯度≥99%）、异丙醇（纯度≥99.7%）和

盐酸等化学试剂均为国产分析纯。

1.2　尿样采集及其预处理

选择制鞋厂鞋底涂粘胶和鞋面粘合车间，通过车间空气苯浓度的区域和个体采样确定86名苯接触工人。用具盖聚乙烯塑料瓶收集工人班后尿50 mL，按1∶100（体积比）的比例加入6 mol/L盐酸。尿样预处理过程是取 5.0 mL尿于10 mL具塞离心管中，5 000 r/min离心15 min，离心半径为15 cm，取上清液2.0 mL于15 mL具塞离心管中，加入2.0 mL水，在涡旋混合器上涡旋约15 s，加0.8 mL 50%（体积比）的硫酸溶液，涡旋约30 s，10 min内加入0.8 mL 7.8 mol/L氢氧化钾溶液，涡旋约30 s，加入5.0 mL氯仿：异丙醇=5∶1（体积比）混合溶剂，盖紧磨口盖，涡旋约50 s，4 000 r/min离心10 min，离心半径为15 cm，将上层尿样转移至另一15 mL离心管中，再加入5.0 mL氯仿：异丙醇=5∶1（体积比）混合溶剂重复萃取，合并2次萃取液，在50℃氮气流下挥干。

1.3　仪器分析

1.3.1　HPLC

LC-10Atvp（双泵）型高效液相色谱仪（日本岛津公司），配有SPD-10Avp紫外检测器、CTO-10ACVP柱温箱；分析柱为十八烷基硅烷（octadecylsilyl，ODS）（150 mm×4.6 mm×5 μm），预柱为ODS（10 mm×4.6 mm×5 μm）；流动相：A相为乙腈；B相为乙腈100 mL，甲醇24 mL，用0.5%三乙胺（水为溶媒，用磷酸调pH=2.16）定容至1 000 mL；流速2.0 mL/min；柱温35℃；紫外检测波长205 nm。进样时用100 μL甲醇溶解残渣，涡旋30 s，5 000 r/min离心5 min，离心半径为15 cm，取20 μL上清液进样，以保留时间定性，峰面积定量计算SPMA质量浓度（μg/L）。

1.3.2　LC/MS

LC/MS-2010EV单重四极杆液相色谱质谱联用仪（日本岛津公司）；LC/MS的接口为电喷雾电离源（ESI），负离子模式；接口电压：4.5 kV；脱溶剂管（CDL）电压，-15 V；分析柱ODS（150 mm×2.0 mm×4.6 μm）；预柱ODS（50 mm×2.0 mm×4.6 um）；流动相：乙腈：0.3%甲酸=25∶75（体积比）；流速0.2 mL/min；柱温35℃；进样量5 μL；CDL温度230℃；模块加热温度，200℃；雾化氮气流速，1.5 L/min。定量测定时采用选择离子监控（SIR）模式，质荷比（m/z）238。进样时用200 μL甲醇溶解残渣，涡旋30 s，10 000 r/min离心5 min，取5 μL上清液进样。以SPMA分子离子峰的保留时间定性，峰面积定量计算SPMA浓度（μg/L）。

1.4　数据统计

在Excel建立数据库，应用SPSS 11.5计算算术均数及其标准差、几何均数及其标准差，并进行线性回归统计分析，绘制散点图。

2　结果

2.1　液相色谱与液质联谱的比较

HPLC方法和LC/MS方法的检出限（LOD）分别为40 μg/L和10 μg/L；SPMA保留时间分别为31 min和7.8 min左右，标准溶液和接苯者尿样的HPLC色谱图和LC/MS色谱图分别见图1和图2。

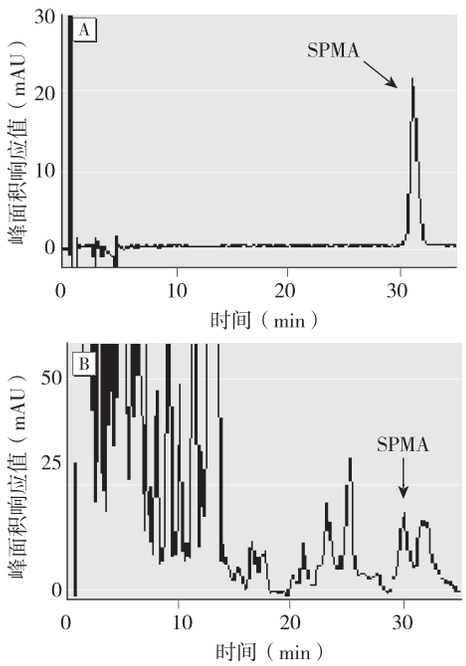

图1　标准溶液（A）和接苯者尿样（B）的HPLC色谱图

Figure 1　HPLC Chromatograms of（A）authentic SPMA dissolved in MeOH and（B）SPMA detected in the urine of a worker exposed to benzene

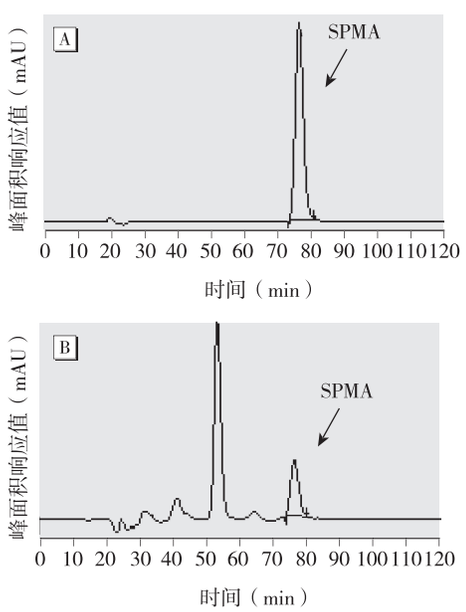

图2　标准溶液（A）和接苯者尿样（B）的LC/MS色谱图

Figure 2　LC/MS Chromatograms of（A）authentic SPMA dissolved in MeOH and（B）SPMA detected in the urine of a worker exposed to benzene

2.2　标准曲线浓度范围

精密称取SPMA标准品40 mg置于100 mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容至刻度，充分摇匀，此溶液为400 mg/L SPMA贮备液，于4℃保存备用。将贮备液充分摇匀后取2.5 mL置于25 mL容量瓶，甲醇稀释至刻度，此为40 mg/L SPMA应用液，再将应用液按浓度梯度稀释成系列标准应用液。以非吸烟、非苯接触者混合尿为溶剂，每管加入混合尿2 mL，分别加入系列标准应用液，配制成SPMA尿液浓度为10、20、40、80、160、320 μg/L标准系列溶液供LC/MS测定用，配制SPMA尿液浓度为40、62.5、125、

250、500、1 000、2 000 μg/L标准系列溶液供HPLC测定用，分别绘制标准曲线。按前述尿样预处理方法操作后进样，每个浓度重复测定6次，以峰面积的均值为 Y，样品浓度的均值为 X，作线性回归分析，结果与参数见表1。

表1　LC/MS及HPLC方法的线性回归参数

Table 1　Overview of the linearity data obtained by the LC/MS and HPLC methods

回归参数 Regression parameters	高效液相色谱 HPLC	液质联用 LC/MS
回归系数 Regression coefficient（r^2）	0.9994	0.9999
斜率 ± 标准差 Slope ± standard deviation	636.781 ± 6.877	1961.429 ± 14.646
截距 ± 标准差 Intercept ± standard deviation	3550.175 ± 6003.276	2885.174 ± 2118.636
标准曲线浓度范围（μg/L） Concentration range	40~2000	10~320

2.3　回收率和精密度

根据标准曲线范围，两种测定方法各选择四分位数质量控制的低、中、高三个浓度，每一浓度6个样本，按样品前处理与分析方法操作步骤，连续6 d对质量分析样品进行测定，分别计算相对回收率、批内精密度和批间精密度，结果见表2和表3。

表2　HPLC回收率及精密度（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Table 2　Recovery and precision of the HPLC method

加标值（μg/L） Add	相对回收率 Recovery（%）	*RSD*（%）	批内精密度（μg/L） Intra-day precision	*RSD*（%）	批间精密度（μg/L） Inter-day precision	*RSD*（%）
125	93.83 ± 10.98	11.70	118.60 ± 17.17	14.48	138.99 ± 12.83	9.23
500	103.66 ± 4.89	4.72	565.44 ± 13.78	2.44	520.82 ± 19.56	3.75
1000	92.64 ± 1.74	1.87	970.39 ± 27.91	2.88	927.22 ± 35.82	3.86

表3　LC/MS回收率及精密度（$\bar{x} \pm s$，n=6）

Table 3　Recovery and precision of the LC/MS method

加标值（μg/L） Add	相对回收率 Recovery（%）	*RSD*（%）	批内精密度（μg/L） Intra-day precision	*RSD*（%）	批间精密度（μg/L） Inter-day precision	*RSD*（%）
40	104.09 ± 6.94	6.27	39.83 ± 3.14	7.89	34.21 ± 2.91	8.49
80	78.36 ± 1.74	2.22	75.29 ± 1.90	2.52	82.26 ± 5.23	6.36
160	85.01 ± 1.58	1.86	167.00 ± 3.29	1.97	194.86 ± 14.96	7.68

2.4　样本测定

分别采用HPLC和LC/MS两种检测方法对86份苯暴露工人尿样进行检测，HPLC检测结果中有13份尿样呈现假阳性，即LC/MS检测数据 < 40 μg/L，而HPLC检测数据 > 40 μg/L。剔除13份假阳性样本后，对检测浓度 > 40 μg/L的73份样本进行两种方法检测结果的比较，其相关系数（r）为0.915，见图3。计算结果显示，HPLC测定值几何均数（646.44 ± 4.18）μg/L较LC/MS（535.42 ± 4.49）μg/L高21%，算术均数（1515.35 ± 1942.34）μg/L较LC/MS（1400.38 ± 1910.11）μg/L高8%，见表4。

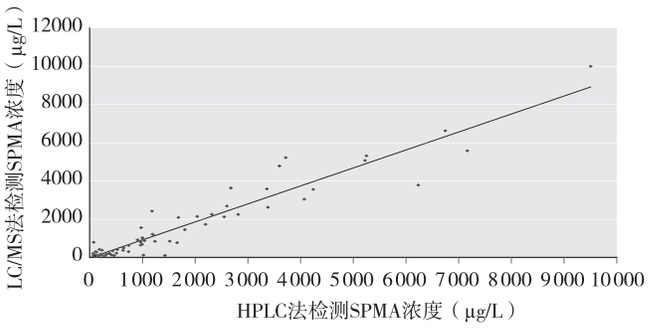

图3　HPLC与LC/MS检测SPMA浓度相关性

Figure 3　Correlation diagram between results obtained by the HPLC and HPLC-MS methods

表4　不同苯暴露水平两种检测方法测定结果比较（μg/L）

Table 4　Comparison between the results of HPLC and LC/MS in different benzene exposure levels

空气苯（mg/m³） Benzene concentration in air	样品数 Number	几何均数 ± 标准差		平均相对差（%）* Mean relative differences	算术均数 ± 标准差		平均相对差（%） Mean relative differences
		LC/MS	HPLC		LC/MS	HPLC	
0~	15	136.23 ± 2.32	165.10 ± 2.56	21	202.73 ± 228.50	268.68 ± 321.07	33
6.50~	18	183.50 ± 2.98	274.41 ± 2.89	50	373.21 ± 595.79	456.88 ± 454.99	22
16.25~	20	808.68 ± 2.91	894.03 ± 2.88	11	1511.68 ± 2280.98	1551.58 ± 2088.75	3
32.50~	20	2594.05 ± 1.94	2813.26 ± 1.90	8	3111.78 ± 1743.26	3366.72 ± 1942.86	8
合计（Total）	73	535.42 ± 4.49	646.44 ± 4.18	21	1400.38 ± 1910.11	1515.35 ± 1942.34	8

［注］*：平均相对差（$C_{HPLC}-C_{LC/MS}$）/ $C_{LC/MS}$；C—尿样中检测SPMA浓度，μg/L。

3　讨论

SPMA是苯在机体内的中间代谢产物环氧化苯与谷胱甘肽在谷胱甘肽-S-转移酶催化下形成的巯基尿酸前体，后者在酸性条件下经脱水反应缩合而成，其分子式为 $C_{11}H_{13}NO_3S$，相对分子量为239.29。SPMA作为苯的代谢产物之一，其特异性在于未见其他化学物或食物中有类似代谢产物的存在[1]。目前，部分发达国家将尿SPMA作为职业苯接触的生物监测指标之一，通过专业组织提出了与其各自国家工作场所空气苯接触限值相应的尿SPMA生物限值。美国ACGIH-BEI推荐的尿SPMA为25 μg/g Cr（TWA=1.6 mg/m³，STEL=8 mg/m³）[5]；德国科学研究联合会生物耐受值（DFG-BAT）规定了致癌物接触当量（EKA），即根据工作场所空气中致癌物浓度与生物材料中致癌物或代谢物间的相关关系来确定接触限值，当接苯浓度为3.3 mg/m³时尿SPMA为45 μg/gCr，接苯浓度为6.5 mg/m³时的尿SPMA为90 μg/gCr，接苯浓度为13 mg/m³时尿SPMA为180 μg/gCr，接苯浓度为19.5 mg/m³时尿SPMA为270 μg/gCr[6]。

目前，检测尿中SPMA主要有LC/MS、GC/MS、GC/ECD和ELISA方法，而在21世纪初，国外对尿中SPMA的检测多使用HPLC方法，BURATTI[7]在尿样预处理中加入单溴胺与SPMA进行衍生化反应，形成具有荧光的衍生物，经RP-HPLC柱梯度洗脱，由荧光检测器进行检测，检测限为1 μg/L，线性范围10~250 μg/L，回收率≥90%。样品衍生化是较为复杂的过程，日本学者INOUE[3]提出了一种不需复杂预处理的HPLC检测方法，在尿样中加入3,5-二甲酚作为内标，调节pH=0.3，加入

乙醚：甲醇混合液振摇萃取，ODS-3 色谱柱分离，流动相为乙腈（100 mL）、甲醇（24 mL）、60% 高氯酸（0.5 mL），加去离子水定容至 1 L；流速为 2 mL/min；检测波长为 205 nm，检测结果检出限为 20 μg/L，加标回收率为 98%。本研究参照该方法，在尿样预处理中采用不同组分及比例的有机溶剂对尿中 SPMA 进行萃取，经过比较发现，氯仿：异丙醇（5∶1，v/v）混合溶剂重复萃取效果较好。尿样中加入 0.8 mL 50% 的硫酸溶液可将 SPMA 前体水解为 SPMA，提高了 SPMA 的提取回收率，与 PACI 等[8]将尿样 pH 调至酸性条件（pH=2），SPMA 检测值为生理尿液（pH=5~7）2 倍的结论类似。在流动相方面，选择乙腈作为流动相 A，乙腈-甲醇-三乙胺为流动相 B，采用梯度洗脱以缩短检测时间。实验中也采用 3,5-二甲酚作为内标，但其保留时间过长（> 60 min）而未选用。

采用两种方法对 86 名职业苯接触者尿中 SPMA 测定值配对分析，结果显示，HPLC 检测数据多数高于 LC/MS 方法，并且有 13 份尿样呈现为假阳性。按个体苯接触水平分组段分析，发现 HPLC 方法检测值在接苯质量浓度 < 16.5 mg/m^3（< 5 ppm）组段存在高估偏倚，而在接苯浓度 ≥ 16.5 mg/m^3（≥ 5 ppm）组段，检测值的高估则逐步减小。高估偏倚的主要原因，一是基体杂质干扰，HPLC 样品峰未能下降到基线水平，导致样品峰的积分面积较实际峰面积增大；二是样品峰受周围杂质峰的影响，分离不完全导致误读。LC/MS 方法则具有高分离和强鉴定能力，对尿中 SPMA 的检测有足够的灵敏度、选择性，同时还能够给出一定的结构信息。研究中采用乙腈–0.3% 甲酸（25∶75，v/v）为流动相，可使 SPMA 色谱峰保留时间短，出峰附近没有杂质峰干扰。全离子峰扫描可见 SPMA 分子离子峰（[M-H]$^-$m/z238）和一个碎片峰（m/z109），其中[M-H]$^-$m/z238 为基峰，将其作为定量分析检测的离子。对 86 名苯接触者的现场研究表明，LC/MS 方法可满足 32.5 mg/m^3（10 ppm）以下苯接触人群生物监测的需要，对我国苯作业场所职业接触限值（TWA = 6 mg/m^3）内的人群可进行有效的生物监测与评价。

目前，部分发达国家将尿 SPMA 作为职业苯接触的生物监测指标之一，并制定了相应的生物限值。我国大陆尿中 SPMA 生物限值尚未制定，但工作场所空气中苯的 PC-TWA 为 6 mg/m^3，与德国致癌物接触当量（EKA）中空气浓度 6.5 mg/m^3 类似，在此浓度下的尿 SPMA 生物限值为 90 μg/gCr[6]。根据本研究的结果，结合 HPLC 分析仪器在国内已逐步普及的现实，建议 HPLC 方法可作为群体职业苯接触者生物监测的初步筛检方法。因此，HPLC 可作为定性半定量检测尿中 SPMA 的方法，LC/MS 可准确定量测定尿中 SPMA 浓度。虽然 HPLC 方法检测灵敏度偏低，但对我国大陆部分地区和企业尚有职业苯接触大幅超标的现实[9]，应用 HPLC 方法测定尿中 SPMA 并结合工作场所空气中苯浓度测定结果，可综合评价工作场所职业卫生条件和劳动者的接触水平。

参考 文献：

[1] FARMER P B，KAUR B，ROACH J，et al. The use of S-phenylmercapturic acid as a biomarker in molecular epidemiology studies of benzene[J]. Chem Biol Interact，2005，153-154：97-102.

[2] MELIKIAN A A，QU Q，SHORE R，et al. Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and trans，trans-muconic acid[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2002，778（1-2）：211-221.

[3] INOUE O，KANNO E，KAKIZAKI E，et al. Urinary phenylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to benzene[J]. Ind Health，2000，38（2）：195-204.

[4] INOUE O，KANNO E，YUSA T，et al. A simple HPLC method to determine urinary phenylmercapturic acid and its application to gasoline station attendants to biomonitor occupational exposure to benzene at less than 1 ppm[J]. Biomarkers，2001，6（3）：190-203.

[5] American conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices[M]. OH：Cincinatti，2006：91-106.

[6] DFG Deiutsche Forschungsgemeinschaft. List of MAK and BAT Values[M]. Weinheim：Wiley-VCH Verlag，2008：195-217.

[7] BURATTI M，BRAMBILLA G，FUSTINONI S，et al. Determination of monobromobimane derivatives of phenylmercapturic and benzylmercapturic acids in urine by high-performance liquid chromatography and fluorimetry[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl，2001，751（2）：305-313.

[8] PACI E，PIGINI D，CIALDELLA A M，et al. Determination of free and total S-phenylmercapturic acid by HPLC/MS/MS in the biological monitoring of benzene exposure[J]. Biomarkers，2007，12（2）：111-122.

[9] LIANG Y X，WONG O，ARMSTRONG T，et al. An overview of published benzene exposure data by industry in China，1960-2003[J]. Chem Biol Interact，2005，153-154：55-64.

（**收稿日期**：2009-04-02）

（英文编审：黄建权；编辑：洪琪；校对：吴德才）