ICS 13.100
C 52

GBZ

中华人民共和国国家职业卫生标准

GBZ/T XXX—XXXX

血中 *N*-甲基氨甲酰血红蛋白加合物的测定 气相色谱-质谱法

Determination of *N*-methylcarbamoylated haemoglobin in blood—

Gas chromatography-mass spectrometry

XXXX-XX-XX 发布 XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发 布

前　言

根据《中华人民共和国职业病防治法》制定本标准。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：江苏省疾病预防控制中心、无锡市第八人民医院、广东省职业病防治院、国家卫生健康委职业安全卫生研究中心。

本标准主要起草人：韩磊、仲立新、赵圆、杨翔、顾振扬、王宏毅、刘立、宋振威、周洁丹、刘武宾

血中*N*-甲基氨甲酰血红蛋白加合物的测定
气相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了测定血中*N*-甲基氨甲酰血红蛋白加合物的气相色谱-质谱法。

本标准适用于职业接触二甲基甲酰胺人员血中*N*-甲基氨甲酰血红蛋白加合物的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GBZ/T 295 职业人群生物监测方法 总则

3 原理

血中的*N*-甲基氨甲酰血红蛋白加合物（NMHb）经酸水解为等摩尔的3-甲基-5-异丙基乙内酰脲（3-methyl-5-isopropylhydantoin，MVH）后，用乙酸乙酯萃取，经气相色谱-质谱（GC-MS）分离检测，以保留时间和特征离子及其丰度比定性，3-甲基-5-异丁基海因（3-methyl-5-isobutylhydantoin，MIH）作为内标，以定量特征离子的峰面积用内标工作曲线法进行定量。

4 仪器

4.1 采血管：5 mL，肝素或乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝。

4.2 离心管：15 mL，塑料圆底。

4.3 容量瓶：10 mL、50 mL、100 mL。

4.4 移液器：100 µL，可调式。

4.5 移液管：1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL。

4.6 天平：感量0.01 mg。

4.7 样品瓶：2 mL、40 mL透明瓶具螺口瓶盖，带聚四氟乙烯（PTFE）隔垫。

4.8 涡旋混合器。

4.9 电热恒温水浴箱：控温精度± 1 ℃。

4.10 精密酸度计：测量范围pH 0.00 ～14.00，测量精度pH 0.01或精密PH试纸（ 精度为0.1）测量。

4.11 离心机：4000 r/min，可用于15 mL离心管、40 mL样品瓶离心。

4.12 真空离心浓缩仪。

4.13 针式过滤器：有机相，直径13 mm，孔径0.45 µm。

4.14 气相色谱质谱联用仪，配有电子轰击离子源（EI），配毛细管色谱柱：5%苯基-甲基聚硅氧烷固定相，规格：30m*0.25mm*0.25µm。

5 试剂

5.1 实验用水：超纯水（电阻率≥18.2 MΩ·cm）。

5.2 盐酸：优级纯。

5.3 冰醋酸：优级纯。

5.4 硫酸铵：分析纯。

5.5 氢氧化钠：分析纯。

5.6 乙酸乙酯：色谱纯，色谱鉴定无干扰杂峰。

5.7 无水硫酸钠：分析纯。

5.8 甲醇：色谱纯。

5.9 牛血清白蛋白（BSA）：纯度≥98 %。

5.10 磷酸盐缓冲溶液：称取 80.0 g 氯化钠、2.0 g 氯化钾、35.8 g 十二水磷酸氢二钠、2.4 g 磷酸二氢钾溶于 1000 mL 水中。或可直接购买成品（PBS，10 ×)。

5.11 甲醇-水溶液（1：1，体积比）。

5.12 盐酸-冰乙酸溶液（2：1，体积比）。

5.13 氢氧化钠溶液：称取 40.0 g 氢氧化钠，溶于超纯水中，用超纯水定容至 100 mL。

5.14 氦气：纯度 99.999 %。

5.15 氮气：纯度 99.999 %。

5.16 MVH：CAS：74310-99-9，标准物质或色谱纯试剂（纯度≥99.0%）。

5.17 MVH 标准溶液：准确称取 15.6 mg MVH，用甲醇-水溶液溶解并定容至 10 mL，制成 10.0 mmol/L 的 MVH 标准贮备液，此溶液可在 4 ℃冰箱中保存 14 d，或用国家认可的标准溶液。

5.18 MIH：CAS：675854-31-6，标准物质或色谱纯试剂（纯度≥99.0%）

5.19 MIH 内标储备液：称取 17.0 mg MIH，用甲醇-水溶液溶解并定容至 50 mL，该内标储备液浓度为 2.0 mmol/L，此溶液可在 4℃冰箱中保存 14 d，或用国家认可的标准溶液。

5.20 MIH 内标工作液：临用前准确吸取 MIH 内标储备液 1.0mL 于 10mL 容量瓶中，用甲醇溶液定容至刻度，该内标溶液浓度为 200.0 nmol/mL。

6 样品的采集、运输和保存

6.1 样品采集和运输

按 GBZ/T 295 要求采集接触工人静脉血 2.5 mL 于采血管中，立即轻轻摇匀，冷藏运输。

6.2 样品制备

6.2.1 血红蛋白提取：取血样 2.0 mL 于 15 mL 离心管中，2000 r/min 离心 15 min，弃去上层血浆；加入 7.0 mL 超纯水，轻轻摇晃约 10 s，立即加入 1.0 mL 磷酸盐缓冲溶液，振荡均匀，1000 r/min 离心 5 min，吸取上清液于另一 15 mL 离心管中，得血红蛋白提取液，备用。血液中血红蛋白提取应在 24 h 内进行。

6.2.2 血红蛋白粉末制备：取上述装有血红蛋白提取液的离心管，放置在真空离心浓缩仪中（45 ℃）干燥至干，制成松散、无结块的血红蛋白粉末约 300 mg。

6.3 样品保存

血红蛋白液若不立即干燥，密封后在 4 ℃条件下可保存 3 d。干燥后血红蛋白粉末在 4 ℃条件下可保存 14 d，在-20℃条件下可保存 30 d，在-80 ℃条件下可保存 60 d。

7 分析步骤

7.1 仪器操作参考条件

a) 毛细管色谱柱：5 %苯基-甲基聚硅氧烷固定相，规格：30 m×0.25 mm×0.25 μm；
b) 柱温：初温 40 ℃, 保持 1 min，以 15 ℃/min 速率升温至 180 ℃，保持 3 min，以 30 ℃/min 速率升温至 300 ℃，保持 4 min；
c) 进样口温度：250 ℃；
d) 进样量：1.0 μL；
e) 进样方式：分流进样；
f) 分流比：10：1；
g) 离子源温度：280 ℃；
h) 传输线温度：300 ℃；
i) 离子化能量：70 eV；
j) 扫描条件：定性选择全扫描模式（SCAN），定量测定选择离子扫描模式（SIM）；MVH 特征离子 m/z 114 、m/z 57，定量离子 m/z 114；MIH 定量离子 m/z 114；
k) 载气（氦气）流量：1.2 mL/min。

7.2 样品处理

准确称取 100.0 mg 血红蛋白粉末置于 40 mL 样品瓶中，向样品瓶中加入 100.0 μL MIH 内标工作液，并加入 5.0 mL 盐酸-冰乙酸溶液，密封。将样品瓶置于电热恒温水浴箱中 95 ℃加热 1 h。冷却后，向样品瓶中加入 3.0 g 硫酸铵，振摇溶解。向样品瓶中滴加氢氧化钠溶液至溶液 pH 值为 3.0～ 4.0（精密酸度计测定）。加入 2.0 mL 乙酸乙酯，密封，涡旋 30 min，再以 1000 r/min 离心 7 min，吸取上层有机相 1.0 mL 转移到 15 mL 离心管中，适当加入少量无水硫酸钠（约 0.5g），充分混匀后吸取液体使用针式过滤器过滤，制成样品溶液。

7.3 工作曲线的配制和测定

取 10 mL 容量瓶，用超纯水将 MVH 标准贮备液稀释，配制成浓度为 0.0 nmol/mL～300.0 nmol/mL 的 MVH 标准系列后，各取 100.0 μL 加入到盛有 100.0 mg 牛血清白蛋白粉末的 40 mL 样品瓶中，分别加入 100.0 μL MIH 内标工作液和 5.0 mL 盐酸-冰乙酸溶液，其余同样品处理，配制 MVH 浓度为 0.0 nmol/mL～15.0 nmol/mL 的 MVH 标准工作系列。参照 7.1 将仪器调节至最佳测定状态，分别进样 1.0 μL，测定各标准系列。以标准工作系列溶液中 MVH 的含量为横坐标，以测得的 MVH 峰面积与内标 MIH 峰面积比值为纵坐标，绘制内标工作曲线。

7.4 样品定性与定量测定

7.4.1 样品定性须满足：

a) 样品中待测组分色谱峰的保留时间与标准品的保留时间相对误差在±2%内；
b) 标准质谱图中相对强度大于 10 %的特征离子均应出现在样品谱图中；
c) 样品中特征离子 m/z 57 与 m/z 114 的丰度比与标准品中 m/z 57 与 m/z 114 的丰度比误差应在 ±20%以内。

7.4.2 样品的定量测定：

用标准系列的操作条件测得样品溶液和样品空白定量离子（m/z 114 ）的峰面积值，由回归方程得 到样品中 MVH（nmol/mL）的浓度。

8 计算

NMHb 经酸水解成 MVH，为 1：1 等摩尔反应，故 NMHb 的摩尔浓度等于测得的 MVH 摩尔浓度。按式（1）计算血中 NMHb 的浓度：

$$c = \frac{c_1 \times 2}{m} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

c ——血中 NMHb 的浓度，单位为纳摩尔每克血红蛋白（nmol/g Hb）；

c_1——测得样品溶液中 MVH 浓度（减去试剂空白），单位为纳摩尔每毫升（nmol/mL）；

2 ——乙酸乙酯萃取液体积，单位为毫升（mL）；

m——血红蛋白粉末质量，单位为克（g）。

9 说明

9.1 本法 MVH 的检出限为 0.07nmol/mL，定量下限为 0.24nmol/mL，测定范围为 0.24 nmol/mL~15.0 nmol/mL。以称量 0.1 g 血红蛋白粉末计，血中 NMHb 最低检出浓度为 1.4 nmol/g Hb，最低定量浓度为 4.8 nmol/g Hb。批内精密度范围为 3.1%~5.1%，批间精密度范围为 2.5%~4.7%；加标回收率范围为 93.2%~101.0%。

9.2 本法可以采用其他等效气相色谱柱测定。

9.3 本法血红蛋白粉末称样量在 20~150 mg 范围内结果可靠。

9.4 MVH 全扫描总离子流色谱图、MVH 选择离子扫描色谱图、MVH 选择离子扫描质谱图分别见图 1～图 3。

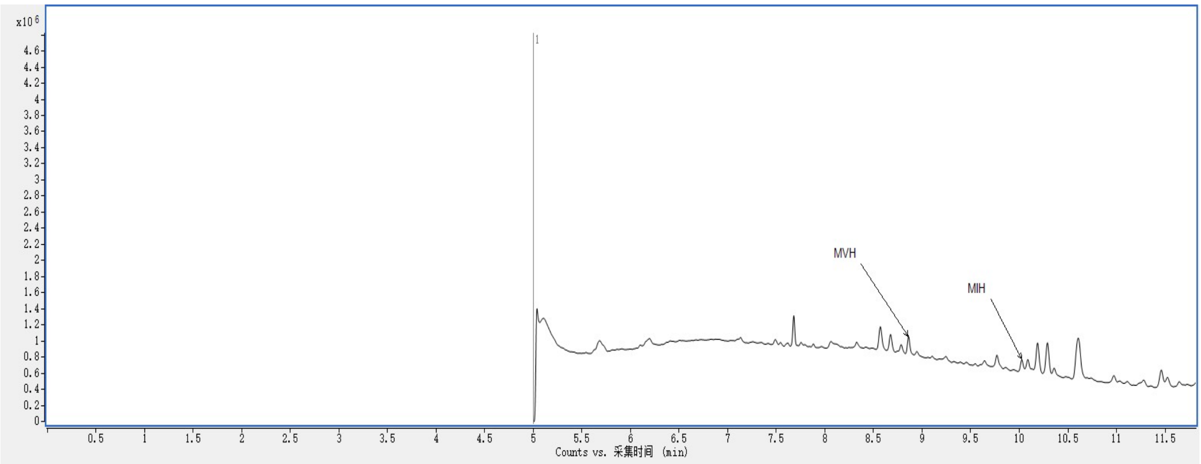

图 1 MVH 全扫描总离子流色谱

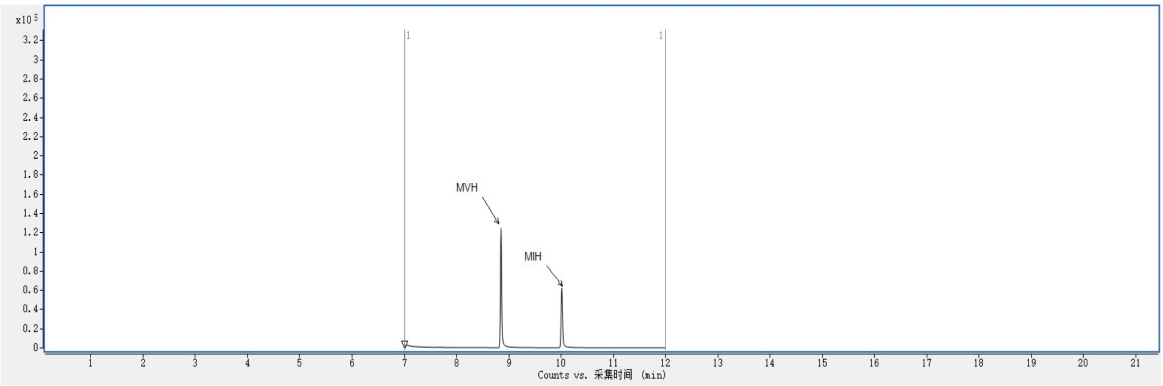

图 2 MVH 选择离子扫描色谱图

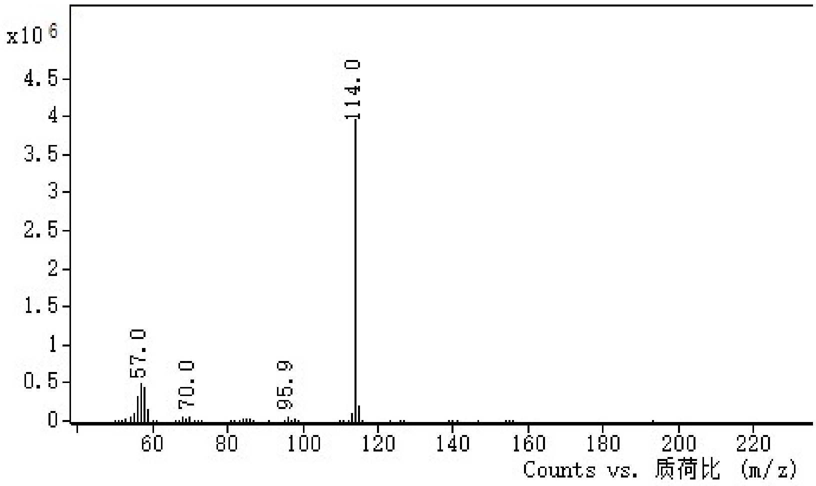

图 3 MVH 选择离子扫描质谱图