Nghiên cứu xác định một số diamin trong nước tiểu bằng phương pháp LC-MS/MS

Tống Thị Ngân[1,2*], Mai Ngọc Thanh[2], Nguyễn Thị Hiền[2], Phạm Thị Quyến[2], Nguyễn Phúc Đán[2], Nguyễn Thị Huyền[2], Nguyễn Thị Minh Hòa[3], Vũ Tùng Lâm[1], Chu Thị Thu Hiền[4], Hoàng Thị Lan Anh[5], Nguyễn Thị Ánh Hường[1†]

[1]Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

[2]Viện Khoa học An toàn và Vệ sinh lao động, Hà Nội, Việt Nam

[3]Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

[4]Bộ môn Hóa học, Khoa Vật liệu xây dựng, Trường Đại học Xây dựng Hà Nội, Việt Nam

[5]Viện Y học dự phòng Quân đội, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 10/11/2022; Ngày chấp nhận đăng: 26/12/2022)

(Ngày đến tòa soạn: 10/11/2022; Ngày chấp nhận đăng: 26/12/2022)

Tóm tắt

Isocyanat là tên gọi chung của các hợp chất hóa học có chứa một hoặc nhiều nhóm -NCO có khả năng phản ứng với nước, rượu, amin để tạo thành dime hoặc trime. Đã có nhiều nghiên cứu cho thấy isocyanat có nguy cơ gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người khi tiếp xúc và có thể gây ra bệnh nhiễm độc nghề nghiệp. Khi thấm nhiễm vào cơ thể các isocyanat bao gồm methylene diphenyl diisocyanat (MDI), toluene diisocyanat (TDI), hexamethylene diisocyanat (HDI), isophorone diisocyanat (IPDI) sẽ chuyển hóa thành các amin tương ứng là 4,4′-methylenedianilin (MDA), toluene diamin (TDA), hexamethylene diamin (HDA), isophorone diamin (IPDA). Do đó, việc xác định hàm lượng các diamin này trong nước tiểu có thể đóng vai trò là chất giám sát sinh học chỉ thị cho việc tiếp xúc với isocyanat. Trong nghiên cứu này, phương pháp sắc ký lỏng ghép nối hai lần khối phổ (LC-MS/MS) đã được sử dụng để nghiên cứu xác định đồng thời ba diamin MDA, HDA, IPDA trong mẫu nước tiểu. Giới hạn phát hiện của phương pháp đối với HDA, MDA và IPDA lần lượt là 0,074; 0,059 và 0,053 ng/mL. Độ thu hồi của phương pháp dao động trong khoảng từ 86,38% đến 105,3% với độ lặp lại RSD < 8%. Phương pháp đã được áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng của HDA, MDA, IPDA trong 30 mẫu nước tiểu của công nhân tại gara sửa chữa ô tô ở Bắc Ninh. Kết quả cho thấy đã phát hiện HDA, MDA và IPDA trong các mẫu này với các mức hàm lượng khác nhau.

Từ khóa: *LC-MS/MS, diamin, MDA, HDA, IPDA, nước tiểu.*

[*]Điện thoại: 0979621566 Email: tongthingan90bn@gmail.com

[†]Điện thoại: 0946593969 Email: nguyenthianhhuong@hus.edu.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Diamin và các hợp chất chứa nitơ khác trong nước tiểu người có thể đóng vai trò là chất giám sát sinh học chỉ thị cho việc tiếp xúc với chất độc. Các diamin trong nước tiểu có thể hình thành khi tiếp xúc với các diisocyanat tương ứng của chúng, được sử dụng trong sơn và chất phủ gốc polyurethan. Các diisocyanat này có thể xâm nhập vào môi trường thông qua chất thải công nghiệp, phun sơn… và phơi nhiễm vào con người thông qua tiếp xúc với da, mắt, nuốt phải và qua hệ hô hấp. Các isocyanat thương mại chính được sử dụng bao gồm methylene diphenyl diisocyanat (MDI), toluene diisocyanat (TDI), hexamethylene diisocyanat (HDI), isophorone diisocyanat (IPDI). Các nghiên cứu cho thấy, isocyanat có thể gây ảnh hưởng đến sức khỏe người lao động và gây ra bệnh nhiễm độc nghề nghiệp [1-2] như: kích ứng da, bệnh phổi tắc nghẽn mãn tính, gây suy giảm chức năng hô hấp, hen phế quản nghề nghiệp và các vấn đề về phổi khác, cũng như kích thích mắt, mũi, cổ họng. Tỷ lệ mắc bệnh hen phế quản ở công nhân tiếp xúc với isocyanat chiếm từ 5 - 15% [3]. Là chất được sử dụng rộng rãi lại gây nhiều tác hại tới sức khỏe con người nên isocyanat được phân loại vào nhóm các hợp chất có tác nhân gây bệnh nghề nghiệp theo ILO 2010 [4]. Ở nước ta, Bộ Y tế đã ban hành Quyết định số 27/QĐ-BYT ngày 21/9/2006 quy định bệnh hen phế quản nghề nghiệp trong đó có tác nhân là isocyant [5]. Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào ở Việt Nam về xác định chất chuyển hóa trong cơ thể người khi tiếp xúc với isocyanat trong môi trường lao động.

Để phân tích phơi nhiễm khi tiếp xúc với isocyanat thì có thể dùng mẫu máu, nước tiểu… để đánh giá. Trong đó, mẫu nước tiểu thường được sử dụng để đánh giá nồng độ tiếp xúc trong môi trường vì dễ thực hiện và cho kết quả tin cậy do các isocyanat chủ yếu đào thải qua nước tiểu [6-11]. Khi thấm nhiễm vào cơ thể, các isocyanat như MDI, HDI, IPDI phản ứng với các nhóm protein như amin, hydroxyl, thiol và có thể được thủy phân thành MDA, HDA, IPDA tương ứng; hoặc có thể tạo thành các sản phẩm trung gian như monoacetyl-MDA, monoacetyl-HDA, monoacetyl-IPDA; hoặc diacetyl- MDA, diacetyl-HAD, diacetyl- IPDA [6-12]. Để chuyển dạng tồn tại monoacetyl hoặc diacetyl về cùng diamin tương ứng cần phải thủy phân mẫu với HCl với thời gian ủ mẫu phù hợp. Sau đó, có thể xác định đồng thời các diamin bằng các phương pháp như GC-MS, LC-MS/MS [13-18]. Trong đó, phương pháp LC-MS/MS được sử dụng phổ biến do đáp ứng được độ nhạy, độ chính xác, cũng như thời gian phân tích phù hợp. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là khảo sát tối ưu hóa quy trình xác định ba diamin (MDA, HDA, IPDA) trong nước tiểu bằng phương pháp LC-MS/MS và bước đầu áp dụng đối với mẫu nước tiểu của các công nhân phun sơn tại gara ô tô.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, ba chất diamin được lựa chọn để phân tích gồm: methylenedianiline (MDA), hexamethylenediamine (HDA) và isophoronediamine (IPDA).

Đối tượng mẫu là nước tiểu được lấy từ các công nhân sơn làm việc ở gara ô tô tại Bắc Ninh. Mẫu trắng được lấy từ nhân viên kế toán tại công ty sản xuất thức ăn chăn nuôi ở Vĩnh Phúc, người không có lịch sử tiếp xúc với các chất nguy cơ lựa chọn trong nghiên cứu này, đồng thời mẫu đã được phân tích trên thiết bị LC-MS/MS không cho tín hiệu trùng với thời gian lưu của các chất phân tích.

2.2. Hóa chất, chất chuẩn

Các hóa chất, chất chuẩn sử dụng trong nghiên cứu này đều thuộc loại tinh khiết phân tích bao gồm:

- Chất chuẩn: hexamethylen diamin (HDA) độ tinh khiết 98%, 4,4′-methylenedianiline (MDA) độ tinh khiết 98%, isophoron diamin (IPDA) độ tinh khiết 98%, được cung cấp từ hãng Sigma- Aldrich (Mỹ). Dung dịch chuẩn gốc 500 µg/mL được chuẩn bị bằng cách cân chính xác khoảng 0,0125g ± 0,0001 từng chất chuẩn HDA, MDA, IPDA vào cốc cân có mỏ riêng biệt. Thêm 5 mL methanol (MeOH)/H_2O (50 : 50; v/v) để hòa tan chuẩn, chuyển lần lượt vào các bình định mức 25 mL, tráng rửa cốc cân và định mức đến vạch bằng MeOH/H_2O (50 : 50; v/v). Dung dịch các chuẩn gốc thu được có nồng độ 500 µg/mL, bảo quản 12 tháng ở nhiệt độ 4°C.

- Các hóa chất khác: methanol (MeOH), amoni hydroxid (NH_4OH), natri hydroxid (NaOH), acid sulfuric (H_2SO_4), acid formic, acetonitril (ACN), acid acetic, acid heptafluorobutyric (HFBA), acid hydrochloric (HCl), acid trifluoroacetic (TFA), toluen, được cung cấp từ hãng Merck (Đức). Nước deion được dùng để pha các dung dịch.

- Cột chiết pha rắn (SPE) loại trao đổi cation mạnh (MCX) 30 mg/3 mL của Phenomenex.

2.3. Thiết bị, dụng cụ

Thiết bị sắc ký lỏng khối phổ gồm hệ thống sắc ký lỏng (LC) 1290 của hãng Agilent kết hợp với khối phổ hai lần (MS/MS) G6430 và một số thiết bị, dụng cụ khác trong phòng thí nghiệm.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp lấy mẫu và xử lý mẫu

- Lấy mẫu nước tiểu: mẫu được lấy ở thời điểm cuối ca của công nhân phun sơn ô tô. Thể tích mẫu là 10 mL được đựng trong lọ nhựa có nắp vặn. Mẫu được bảo quản trong thùng giữ nhiệt có gel đá lạnh trước khi chuyển về phòng thí nghiệm. Nếu chưa phân tích ngay, mẫu được chia thành các ống nhỏ thể tích 1,5 mL, bảo quản trong tủ lạnh sâu ở -

80°C [16-19]. Khi phân tích chỉ lấy từng ống, rã đông ở nhiệt độ phòng và thực hiện quá trình xử lý, phân tích mẫu.

- Xử lý mẫu [14-16]: lấy chính xác 250 µL mẫu nước tiểu, thêm 100 µL HCl 6 N và 650 µL nước, lắc đều. Mẫu được đặt trong bộ gia nhiệt ở 80°C trong 4 giờ. Sau đó mẫu được làm nguội đến nhiệt độ phòng. Điều chỉnh đến pH ~ 1,0 bằng 500 µL NaOH 1 N trước khi thực hiện quá trình chiết pha rắn (SPE). Hoạt hóa cột SPE bằng 1 mL MeOH và 1 mL H_2O. Nạp 1,5 mL mẫu qua cột, rửa tạp bằng 1 mL H_2O, 1 mL MeOH; rửa giải chất phân tích bằng dung dịch NH_4OH có nồng độ 5% và 10% pha trong methanol. Sau đó, mẫu được cô đến khô bằng khí N_2 ở 60°C. Cặn được hòa tan với 1 mL dung dịch nước : MeOH (95 : 5; v/v) chứa 0,1% heptafluorobutyric (HFBA) rồi phân tích trên hệ thống LC-MS/MS.

2.4.2. Khảo sát điều kiện phân tích và đánh giá phương pháp

- Việc khảo sát điều kiện thích hợp để phân tích đồng thời HDA, MDA, IPDA bằng phương pháp LC-MS/MS được thực hiện với dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ 50 ng/mL. Khảo sát các điều kiện khối phổ (MS): tìm các điều kiện tối ưu của MS để xác định ion mẹ và lựa chọn các ion con phù hợp. Khảo sát điều kiện sắc ký lỏng: khảo sát thành phần pha động, tỷ lệ các dung môi trong pha động. Việc khảo sát được thực hiện theo phương pháp đơn biến, thay đổi một thành phần trong khi giữ nguyên các thành phần còn lại để thu được thông số phù hợp đáp ứng các yêu cầu phân tích.

- Phương pháp được đánh giá các thông số cơ bản gồm: đánh giá độ đặc hiệu, xây dựng đường chuẩn, giới hạn phát hiện và định lượng, đánh giá độ chụm thông qua độ lặp lại và độ đúng thông qua độ thu hồi. Các kết quả được đánh giá so sánh với các quy định của AOAC [20].

- Giới hạn phát hiện (MDL), giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

Thêm hỗn hợp chuẩn HDA, MDA, IPDA nồng độ 0,5 ng/mL vào nền mẫu trắng, thực hiện với 10 mẫu lặp.

Theo cách tiếp cận của USEPA, việc tính giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp được thực hiện như sau [8]:

- Giá trị giới hạn phát hiện của phương pháp MDL = S*t

Trong đó: S - là độ lệch chuẩn;

t - giá trị được tính theo số lần thí nghiệm lặp lại (N = 9 thì t = 2,89);

- Giới hạn định lượng của phương pháp MQL = 3*MDL

Việc lựa chọn nồng độ để khảo sát tính toán MDL phải thỏa mãn:

MDL < [nồng độ thí nghiệm] < 10*MDL

2.4.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và Minitab 18.

Cách tính nồng độ HDA, MDA, IPDA trong mẫu nước tiểu (tính theo đơn vị trong tiêu chuẩn giám sát sinh học của HDA, MDA):

HDA, MDA, IPDA được định lượng bằng phương pháp đường chuẩn được lập trong khoảng nồng độ của mỗi chất từ 0,5 đến 100 (ppb), hệ số tương quan R^2 lớn hơn 0,99. Nồng độ HDA, MDA, IPDA trong mẫu nước tiểu trong mẫu được tính theo công thức:

$$\text{Nồng độ} = \frac{C}{C_{creatinin}} \ (\mu g/g \text{ creatinin})$$

Trong đó:

C: nồng độ HDA, MDA, IPDA trong dịch chiết cuối cùng (µg/L)

$C_{Creatinin}$: nồng độ creatinin trong mẫu nước tiểu (g/L)

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Khảo sát các điều kiện LC-MS/MS nhằm xác định đồng thời HDA, MDA, IPDA trong mẫu nước tiểu

3.1.1. Khảo sát điều kiện LC-MS/MS

Trên cơ sở tham khảo tài liệu [16], việc khảo sát ion mẹ, ion con được thực hiện với chế độ khảo sát tự động để bắn phá ion phân tử mẹ thành các ion con. Hai ion con được lựa chọn cho mỗi chất, ion con có cường độ cao hơn được sử dụng để định lượng và ion có cường độ thấp hơn dùng để xác nhận, các kết quả được trình bày trong Bảng 1.

***Bảng 1**. Các điều kiện MS/MS phân tích HDA, MDA và IPDA*

STT	*Chất phân tích*	*Khối lượng phân tử*	*Năng lượng bắn phá CE (E)*	*Năng lượng bắn phá Fragmentor (V)*	*Ion mẹ (M^{+1}) (m/z)*	*Ion con (m/z)*
1	HDA	116,1	9	81	117,1	**100,1***
			17	81		55,0
2	MDA	198,2	25	128	199,2	**106,0***
			25	128		182,1
3	IPDA	170,1	10	102	171,1	**154,4***
			22	102		95,4

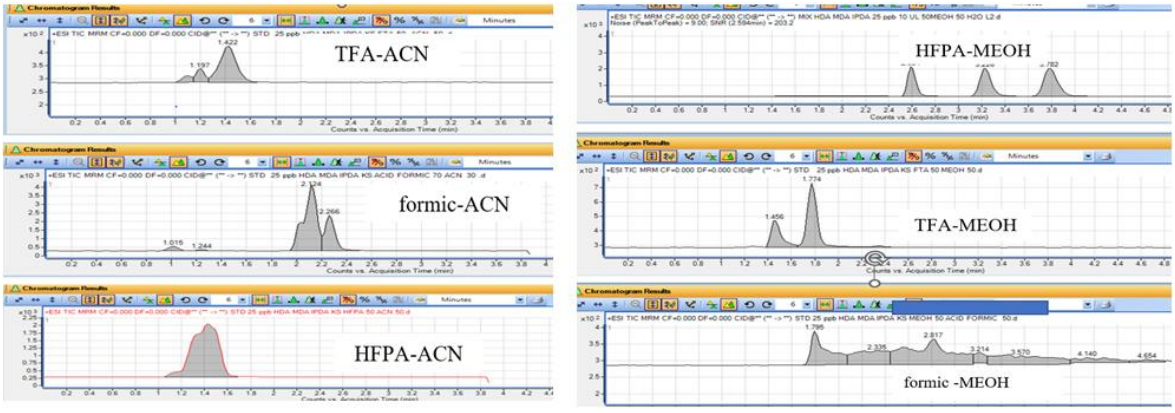
Qua kết quả ở Bảng 1 cho thấy, điều kiện khối phổ hoàn toàn phù hợp với công thức phân tử của HDA, MDA, IPDA, số khối của các ion mẹ tương ứng với từng chất phân tích, chúng đều có dạng là $[M+H]^+$, mỗi chất thu được 2 ion con. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu trước đây [13, 16].

3.1.2. Khảo sát lựa chọn pha động

a) Khảo sát thành phần pha động

Trong phương pháp sắc ký lỏng khối phổ, pha động không chỉ ảnh hưởng tới quá trình tách các chất mà còn ảnh hưởng tới quá trình ion hóa và tín hiệu của chất phân tích. Với kĩ thuật ion hóa phun điện tử bắn phá ở chế độ ion dương, quá trình ion hóa tăng khi có thêm các chất tạo cặp ion như: acid heptafluorobutyric (HFBA), acid trifluoroacetic (TFA), pentafluoropropionic anhydride (PFPA), acid formic. Do đó, dung dịch pha động được thêm lần lượt các chất này để khảo sát hiệu quả phân tách với dung dịch chuẩn hỗn hợp HDA, MDA, IPDA 25 ng/mL.

Thành phần pha động dùng trong khảo sát: kênh B lần lượt là ACN, và MeOH; kênh A lần lượt là acid heptafluorobutyric (HFBA) 0,1 %, acid trifluoroacetic (TFA) 0,1 %, acid formic 0,1 % trong nước. Kết quả khảo sát được thể hiện trong Hình 1.



***Hình 1**. Kết quả khảo sát thành phần pha động*

Kết quả thu được ở Hình 1 cho thấy, tín hiệu diện tích pic của các chất phân tích tăng khi sử dụng pha động có thêm các chất tạo cặp ion theo thứ tự HFPA > TFA > acid formic. Khi sử dụng pha động là MeOH thêm HFBA 0,1% cho thời gian lưu ngắn, diện tích pic cao nhất, có thể làm tăng độ nhạy của phương pháp. Do đó, pha động MeOH thêm HFBA 0,1% trong nước được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

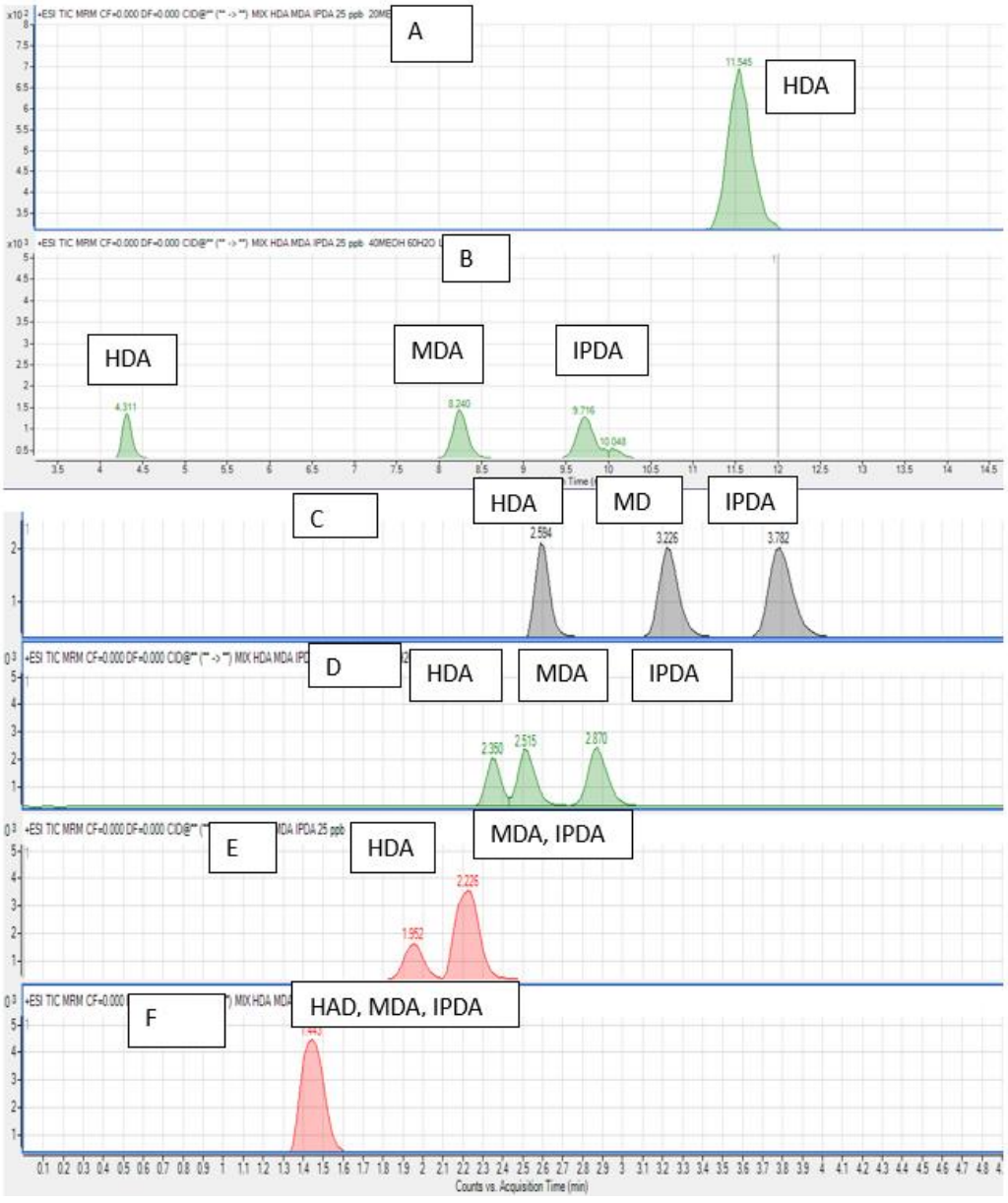
b) Khảo sát tỷ lệ thành phần pha động

Sau khi khảo sát lựa chọn được thành phần pha động phù hợp, độ phân cực thông qua điều chỉnh tỷ lệ thành phần pha động MeOH - HFBA 0,1% trong nước tương ứng là: Thí nghiệm (TN) 1 (20 - 80%); TN 2 (40 - 60%); TN 3 (50 - 50%); TN 4 (55 - 45%); TN 5 (60 - 40%), TN 6 (80 - 20%) cũng được khảo sát với 2 kênh như sau:

- Kênh A: dung dịch HFBA 0,1% trong nước.

- Kênh B: dung môi MeOH thêm HFBA 0,1%.

Kết quả khảo sát được thể hiện trong Hình 2.



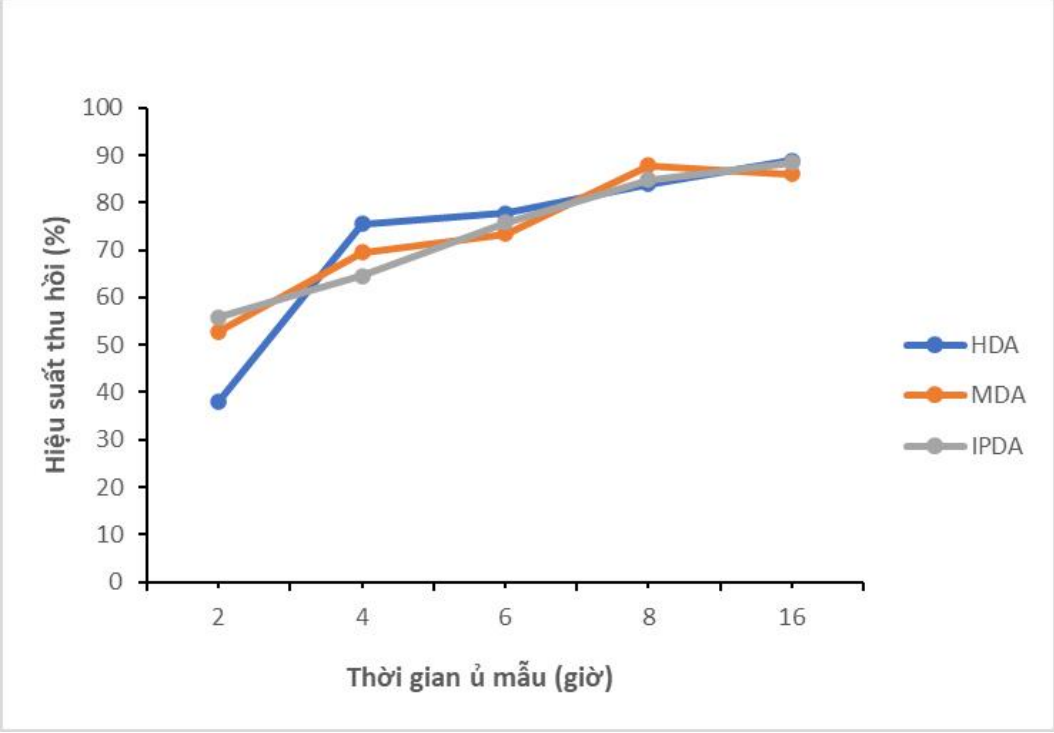
Hình 2. *Kết quả sắc đồ khảo sát tỷ lệ dung môi ảnh hưởng đến sự phân tích các chất phân tích. A: TN 1, B: TN 2, C: TN 3, D: TN 4, E: TN 5, F: TN 6.*

Kết quả khảo sát ở Hình 2 cho thấy, khi phân tích với chế độ đẳng dòng (isocractic) ở tỷ lệ MeOH: HFBA (50 : 50; v/v) (Hình C) thu được tín hiệu các chất phân tích lớn, độ phân giải tốt với thời gian lưu ngắn. Do đó, tỷ lệ dung môi này được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.2. Khảo sát quy trình xử lý mẫu

a) Khảo sát thời gian ủ mẫu

Do các chất HDA, MDA, IPDA tồn tại trong nước tiểu ở nhiều dạng khác nhau nên cần có thời gian ủ mẫu để chuyển về một dạng của từng chất phân tích. Thời gian ủ mẫu được khảo sát trong khoảng 2 - 16 giờ với 5 giá trị: 2, 4, 6, 8, 16 giờ ở mức nồng độ thêm chuẩn là 35 ng/mL, chiết SPE sử dụng cột MCX. Kết quả thu được thể hiện ở Hình 3.



Hình 3. *Kết quả khảo sát thời gian ủ mẫu*

Kết quả khảo sát ở Hình 3 cho thấy, thời gian ủ mẫu từ 8 - 16 giờ có hiệu suất thu hồi đều đạt trên 80% cho cả ba chất HDA, MDA, IPDA. Ở thời gian ủ mẫu ngắn, các amin chưa được chuyển hóa hoàn toàn làm giảm tín hiệu của các chất phân tích. Khi tăng thời gian ủ mẫu cho hiệu suất tăng lên. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi ở 16 giờ tăng không đáng kể so với 8 giờ. Do đó, thời gian ủ mẫu 8 giờ được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

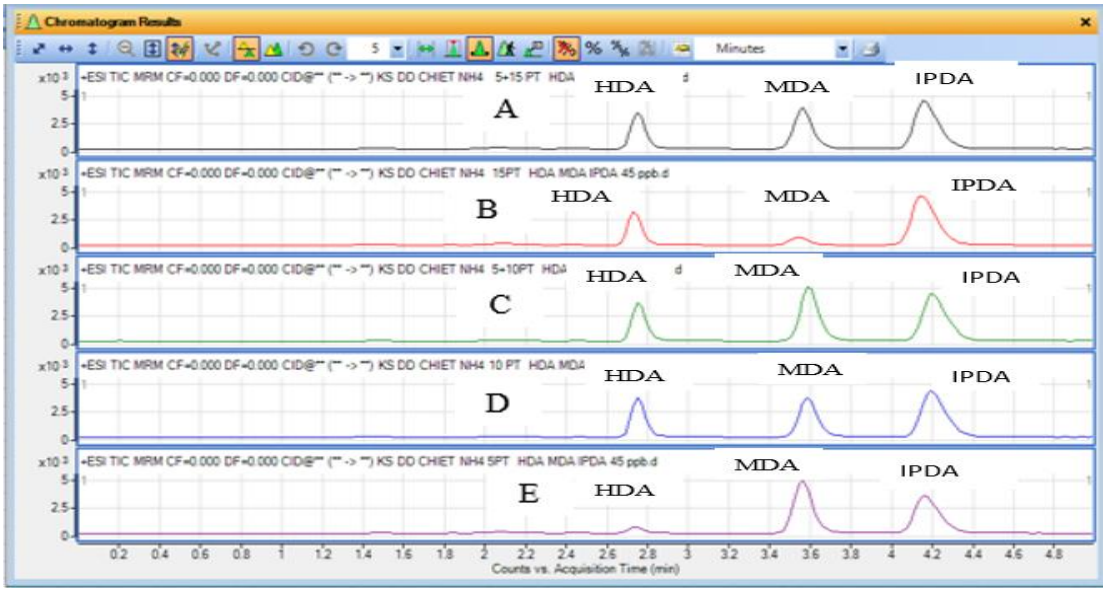
b) Khảo sát dung môi rửa giải

Đối tượng nghiên cứu là mẫu nước tiểu có thành phần phức tạp. Do đó, cần phải có quá trình làm sạch mẫu trước khi bơm vào thiết bị phân tích. Trong nghiên cứu này, cột SPE loại MCX được sử dụng để làm sạch mẫu và làm giàu chất phân tích. Quy trình qua cột được thực hiện như trong mục 2.4.1. Trong đó, nồng độ dung dịch rửa giải NH_4OH pha trong MeOH được khảo sát với các giá trị: NH_4OH 5%, NH_4OH 10%, NH_4OH 15%,

NH_4OH 5% + NH_4OH 10%, NH_4OH 5 % + NH_4OH 15%. Kết quả nồng độ (Ctt) và độ thu hồi (R) của các chất đo được khi thêm chuẩn HDA, MDA, IPDA 45 ng/mL trên nền mẫu trắng thể hiện trong Bảng 2 và Hình 4.

***Bảng 2**. Khảo sát dung môi rửa giải đối với các HDA, MDA, IPDA*

Nồng độ NH_4OH	***HAD***		***MDA***		***IPDA***	
	C tt (ng/mL)	***R%***	***C tt (ng/mL)***	***R%***	***C tt (ng/mL)***	***R%***
Khảo sát A: NH_4OH 5 % + NH_4OH 15 %	40,71	90,47	36,89	81,98	46,12	102,49
Khảo sát B: NH_4OH 15 %	37,05	82,33	7,12	15,82	46,82	104,04
Khảo sát C: NH_4OH 5 % + NH_4OH 10 %	42,65	94,78	46,51	103,36	45,61	101,36
Khảo sát D: NH_4OH 10 %	41,26	91,69	35,63	79,18	44,61	99,13
Khảo sát E: NH_4OH 5 %	6,12	13,60	46,61	103,58	37,82	84,04



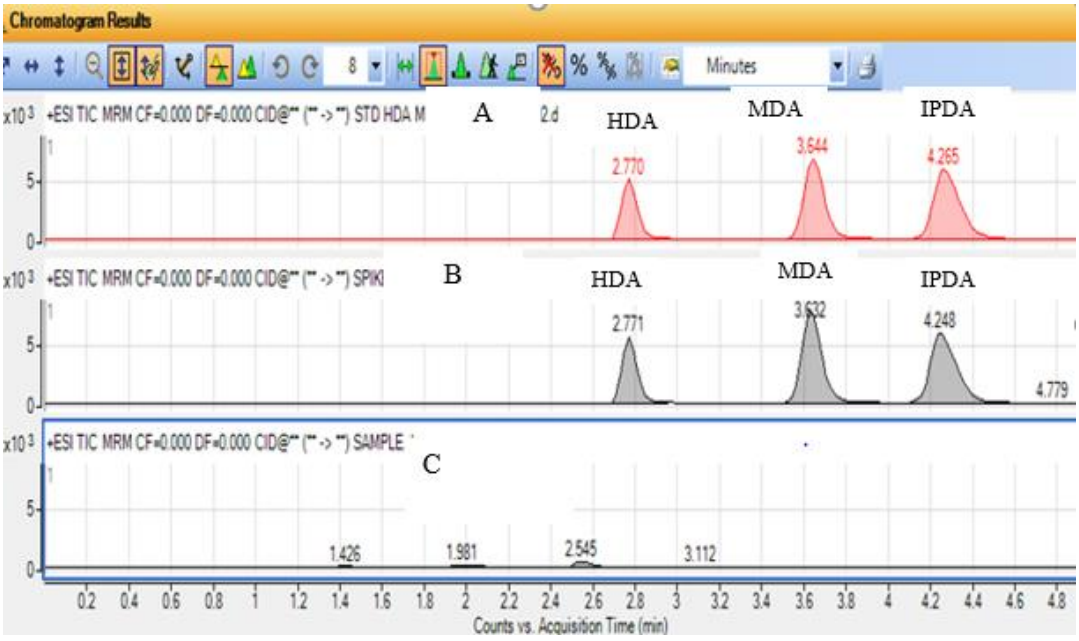
***Hình 4**. Kết quả sắc đồ khảo sát nồng độ dung dịch rửa giải. A: NH_4OH 5% + NH_4OH 15%; B: NH_4OH 15%; C: NH_4OH 5%+ NH_4OH 10%,; D: NH_4OH 10%; E: NH_4OH 5%*

Kết quả khảo sát ở Hình 4 và Bảng 2 cho thấy, IPDA được rửa giải tốt ở tất cả các nồng độ NH_4OH. Trong khi đó, ở nồng độ NH_4OH thấp 5%, MDA được rửa giải gần như hoàn toàn ra khỏi cột nhưng HDA lại hầu như không được rửa giải. Ngược lại, ở nồng độ NH_4OH 10%, HDA được rửa giải gần như hoàn toàn nhưng MDA không được rửa giải hoàn toàn ra khỏi cột. Do vậy, để tăng khả năng chiết cả 3 chất HDA, MDA, IPDA, dung dịch NH_4OH ở hai nồng độ khác nhau là 5% và 10% được chọn kết hợp để rửa giải hoàn toàn các chất phân tích ra khỏi cột. Trong đó, dung dịch NH_4OH 5% (1 mL) rửa giải trước, sau đó đến dung dịch NH_4OH 10% (1 mL) pha trong MeOH.

3.3. Thẩm định phương pháp

3.3.1. Độ đặc hiệu của phương pháp

Sau khi lựa chọn được các điều kiện phân tích và xử lý mẫu nhằm xác định đồng thời ba diamin, phương pháp được thẩm định. Trước hết, độ đặc hiệu của phương pháp được đánh giá bằng cách tiến hành phân tích mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn (Hình 5). Trên sắc đồ mẫu trắng không có tín hiệu của chất phân tích, mẫu chuẩn và mẫu trắng thêm chuẩn có xuất hiện tín hiệu của HDA, MDA, IPDA ở thời gian trùng khớp với thời gian lưu của chuẩn tương ứng (chênh lệch thời gian lưu không quá 2%).



***Hình 5**. Sắc đồ mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thêm chuẩn HDA, MDA, IPDA.*
A: mẫu chuẩn, B: mẫu thêm chuẩn, C: mẫu trắng

Đồng thời, độ đặc hiệu cũng được đánh giá qua số điểm IP đối với các chất phân tích. Theo cách tính điểm IP của EU 2021/804 [21] đối với mỗi ion mẹ là 1 điểm, mỗi ion con là 1,5 điểm, thiết bị LC-MS/MS là 1 điểm. Kết quả thu được trên mẫu chuẩn và trên mẫu trắng thêm chuẩn cho thấy HDA, MDAvà IPDA đều có số điểm IP = 5 ≥ 4; thỏa mãn

yêu cầu phân tích khối phổ LC-MS/MS của AOAC [2]. Như vậy, phương pháp có độ đặc hiệu tốt để phân tích đồng thời HDA, MDA, IPDA.

3.3.2. Xây dựng đường chuẩn

Các dung dịch dùng để dựng đường chuẩn được pha loãng từ các dung dịch chuẩn gốc. Mỗi điểm được phân tích lặp lại 3 lần, diện tích pic trung bình thu được sẽ là số liệu để dựng đường chuẩn sự phụ thuộc của diện tích pic vào nồng độ. Từ đó, đường chuẩn 7 điểm xác định HDA, MDA, IPDA được xây dựng trong khoảng nồng độ từ 0,50 - 100,0 ng/mL. Kết quả được thể hiện trong Bảng 3.

***Bảng 3**. Đường chuẩn xác định HDA, MDA, IPDA bằng phương pháp LC-MS/MS*

Chất phân tích	***Phương trình hồi quy y = a + bx***	***Hệ số tương quan R^2***	***Khoảng đường chuẩn (ng/mL)***
HDA	y = 60,8 + 367,9x	0,9998	0,50 - 100,0
MDA	y = -69,0 + 914,7x	0,9999	0,50 - 100,0
IPDA	y =105,7 + 704,9x	0,9999	0,50 - 100,0

Khoảng làm việc và độ chệch của các điểm chuẩn của từng chất phân tích được trình bày ở Bảng 4.

***Bảng 4.** Khoảng làm việc và độ chệch*

C (ng/mL)	***HDA***		***MDA***		***IPDA***	
	C tính lại (ng/mL)	***Độ chệch (%)***	***C tính lại (ng/mL)***	***Độ chệch (%)***	***C tính lại (ng/mL))***	***Độ chệch (%)***
0,50	0,51	2,00	0,54	8,00	0,46	- 8,00
1,00	1,02	2,00	1,07	7,00	0,98	- 2,00
5,00	4,84	- 3,20	4,64	- 7,20	4,78	- 4,40
10,00	9,89	- 1,10	9,90	- 1,00	10,01	0,10
20,00	20,08	0,40	19,62	- 1,90	20,38	1,90
40,00	40,82	2,05	40,66	1,65	40,82	2,05
60,00	61,54	2,57	59,98	- 0,03	60,98	1,63
100,0	100,1	0,03	99,37	- 0,63	100,1	0,07

Kết quả cho cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,50 - 100,0 ng/mL, nồng độ và diện tích pic có mối quan hệ tuyến tính đối với cả 3 chất HDA, MDA, IPDA, với hệ số tương quan hồi quy (R^2 > 0,99), độ chính xác của tất cả các điểm đáp ứng yêu cầu, giá trị độ

chệch từng điểm chuẩn có giá trị nằm trong khoảng ± 15%. Vì vậy, khoảng nồng độ từ 0,50 - 100,0 ng/mL được lựa chọn là khoảng định lượng.

3.3.3. Giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp

Trên cơ sở đường chuẩn đã xây dựng, giới hạn phát hiện (MDL) và giới hạn định lượng (MQL) của phương pháp đã được xác định bằng cách phân tích lặp lại 6 lần ở mức nồng độ thêm chuẩn 0,5 ng/mL trên nền mẫu trắng. Kết quả khảo sát thu được như trong Bảng 5.

Bảng 5. *Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng của phương pháp*

Tên chất	*MDL (ng/mL)*	*MQL (ng/mL)*
HDA	0,074	0,24
MDA	0,059	0,19
IPDA	0,053	0,18

Từ kết quả ở Bảng 5 cho thấy, các giá trị MDL, MQL thu được là khá nhỏ, do đó phương pháp có độ nhạy cao, phù hợp để phân tích lượng vết, cỡ ppb của HDA, MDA, IPDA trong mẫu nước tiểu.

3.3.4. Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp

Độ lặp lại và độ thu hồi của phương pháp được đánh giá ở các mức nồng độ HDA, MDA, IPDA 0,50; 8,00; 30,00; 70,00 ng/mL thêm vào mẫu trắng với 06 thí nghiệm lặp lại. Kết quả thu được trong Bảng 6.

Bảng 6*. Độ lặp lại, độ thu hồi của phương pháp*

Chất phân tích	*0,50 ng/mL, n = 6*		*8,00 ng/mL, n = 6*		*30,00 ng/mL, n = 6*		*70,00 ng/mL, n = 6*	
	R (%)	*RSD (%)*	*R (%)*	*RSD (%)*	*R (%)*	*RSD (%)*	*R (%)*	*RSD (%)*
HDA	102,00	5,68	99,64	5,54	97,70	5,26	97,39	2,03
MDA	105,33	4,27	97,22	4,10	96,43	3,24	100,81	2,62
IPDA	90,67	7,07	86,38	4,40	96,54	3,23	94,28	2,16

Từ kết quả thu được ở Bảng 6 cho thấy, cả 3 mức nồng độ đều có độ lệch chuẩn tương đối (RSD) nhỏ hơn 8% và độ thu hồi của các chất phân tích dao động trong khoảng 86,38 - 105,3%, cho thấy phương pháp có chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu theo AOAC [16] (RSD ≤ 15% tại mức nồng độ 10 ppb và độ thu hồi trong khoảng 80 - 115%).

3. Phân tích mẫu thực tế

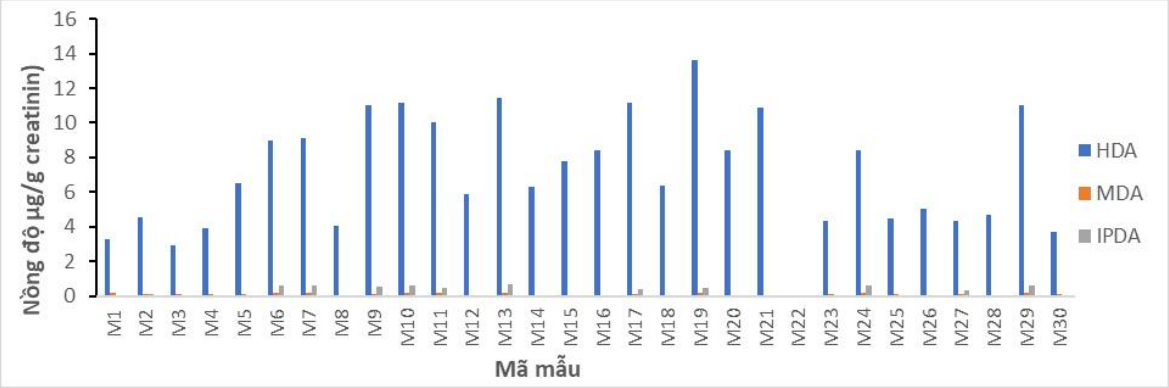
Trên cơ sở các kết quả thẩm định đáp ứng yêu cầu của AOAC, phương pháp đã được áp dụng để xác định đồng thời hàm lượng của HDA, MDA, IPDA trong 30 mẫu nước tiểu

của công nhân tại gara ô tô ở Bắc Ninh. Kết quả hàm lượng HDA, MDA, IPDA trong mẫu nước tiểu được thể hiện ở Bảng 7 và Hình 6.

Bảng 7. *Kết quả định lượng HDA, MDA, IPDA các mẫu nước tiểu*

STT	***Mã mẫu***	***HDA (ng/mL)***	***MDA (ng/mL)***	***IPDA (ng/mL)***	***HDA (µg/g creatinin)***	***MDA (µg/g creatinin)***	***IPDA (µg/g creatinin)***
1	M1	6,80	0,37	-	3,30	0,18	-
2	M2	12,89	0,35	0,33	4,55	0,12	0,12
3	M3	6,27	0,30	-	2,94	0,14	-
4	M4	8,34	0,31	-	3,92	0,14	-
5	M5	14,64	0,31	-	6,48	0,14	-
6	M6	26,48	0,46	1,68	8,96	0,16	0,57
7	M7	21,4	0,37	1,36	9,12	0,16	0,58
8	M8	11,61	-	-	4,08	-	-
9	M9	26,43	0,33	1,19	11,04	0,14	0,50
10	M10	23,21	0,41	1,18	11,16	0,2	0,57
11	M11	22,96	0,35	1,04	10,04	0,15	0,45
12	M12	17,48	-	-	5,86	-	-
13	M13	24,2	0,33	1,39	11,44	0,15	0,66
14	M14	17,16	-	-	6,31	-	-
15	M15	17,24	-	-	7,81	-	-
16	M16	18,45	-	-	8,43	-	-
17	M17	27,6	0,31	0,91	11,17	0,13	0,37
18	M18	17,8	-	-	6,38	-	-
19	M19	28,57	0,37	0,94	13,6	0,18	0,45
20	M20	24,65	-	-	8,44	-	-
21	M21	24,19	-	-	10,88	-	-
22	M22	-	-	-	-	-	-
23	M23	10,32	0,30	-	4,35	0,13	-
24	M24	17,24	0,37	1,18	8,38	0,18	0,58
25	M25	10,39	0,30	-	4,45	0,13	-
26	M26	14,12	-	-	5,03	-	-
27	M27	13,06	0,32	1,01	4,35	0,11	0,34
28	M28	14,19	-	-	4,70	-	-
29	M29	32,02	0,42	1,70	11,04	0,15	0,59
30	M30	9,86	0,31	-	3,69	0,12	-

Ghi chú*: "-" nhỏ hơn MDL*



***Hình 6**. Kết quả hàm lượng HDA, MDA, IPDA trong các mẫu nước tiểu*

Kết quả phân tích mẫu thực tế cho thấy đã phát hiện 29/30 mẫu có hàm lượng HDA, chiếm tỷ lệ cao 96,67%; 19/30 mẫu có hàm lượng MDA, chiếm tỷ lệ 63,33%; 12/30 mẫu có hàm lượng IPDA, chiếm tỷ lệ 40,00%. Hàm lượng của ba diamin trong các mẫu nước tiểu thu thập được dao động tương ứng trong khoảng từ nhỏ hơn MQL đến 13,6 µg/g creatinin đối với HDA, đến 0,20 µg/g creatinin đối với MDA, đến 0,66 µg/g creatinin đối với IPDA. Tuy nhiên, tất cả các mẫu đều có hàm lượng HDA, MDA, IPDA nằm trong tiêu chuẩn cho phép theo quy định của Đức và của Mỹ (NIOSH) (HDA < 15 µg/g creatinin; MDA < 10 µg/g creatinin).

4. KẾT LUẬN

Như vậy, nghiên cứu đã thành công trong việc xây dựng phương pháp LC-MS/MS nhằm xác định đồng thời 4,4′-methylenedianilin (MDA), hexamethylen diamin (HDA), isophoron diamin (IPDA) trong mẫu nước tiểu. Phương pháp đã được thẩm định về độ tuyến tính trong khoảng đường chuẩn, độ chụm và độ đúng đáp ứng yêu cầu của AOAC. Phương pháp đã được áp dụng để xác nồng độ HDA, MDA, IPDA trong 30 mẫu nước tiểu của công nhân sơn ô tô tại 1 gara ô tô ở Bắc Ninh. Kết quả bước đầu cho thấy đã có sự phơi nhiễm của các công nhân này đối với các chất phân tích, tuy nhiên, mức hàm lượng vẫn nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của Đức và Mỹ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1]. Aalto-Korte, K., et al, "Occupational contact allergy to monomeric isocyanates," *Contact Dermatitis*, vol. 67, no. 2, pp. 78-88, 2012.

[2]. Parker, John E., Petsonk, E. Lee, and Weber, Susan L, "Hypersensitivity pneumonitis and organic dust toxic syndrome," *Immunology and Allergy Clinics of North America*, vol. 12, no. 2, pp. 279-290, 1992.

[3]. Redlich, C. A. and Karol, M. H, "Diisocyanate asthma: clinical aspects and immunopathogenesis," *International Immunopharmacol*, vol. 2, no. 2, pp. 213-224, 2002.

[4]. International Labour Office, *List of Ocupational Disease,* Occupational Safety and Health Series, no.74, 2010.

[5]. Ministry of Health, "Decision No. 27/2006/QD-BYT on adding 04 occupational diseases to the list of insured occupational diseases," 2006 (in Vietnamese).

[6]. M. Mirmohammadi, M. Ibrahim, and G. Saraji, "Evaluation of Hexamethylene Diisocyanate as an Indoor Air Pollutant and Biological Assessment of Hexamethylene Diamine in the Polyurethane Factories," pp. 81-98, 2011.

[7]. A. Maitre, M. Berode, A. Perdrix, M. Stoklov, J. M. Mallion, H. Savolainen, "Urinary hexane diamine as an indicator of occupational exposure to hexamethylene diisocyanate," *International Archives Occupational and Environmental Health*, vol. 69, no.1, pp. 65-68, 1996.

[8]. L. M. Fabbri, D. Danieli, S. Crescioli, P. Bevilacqua, S. Meli, M. Saetta, and C. E. Mapp, "Fatal asthma in a subject sensitized to toluene diisocyanate," *The American Review of Respiratory Disease*, vol. 137, no. 6, pp. 1494-1498, 1988.

[9]. L. G. T. Gaines, K. W. Fent, S. L. Flack, J. M. Thomasen, L. M. Ball, D. B. Richardson, K. Ding, S. G. Whittaker, and L. A. Nylander-French, "Urine 1,6-hexamethylene diamine (HDA) levels among workers exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI)," The *Annals of Occupation Hygiene*, vol. 54, no.6, pp. 678-691, 2010.

[10]. H. Tinnerberg, G. Skarping, M. Dalene, and L. Hagmar "Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate and isophorone diisocyanate," *International Archives Occupational and Environmental Health*, vol. 67, no. 6, pp. 367-374, 1995.

[11]. H. Wikman, P. Piirilä, C. Rosenberg, R. Luukkonen, K. Kääriä, H. Nordman, H. Norppa, H. Vainio, and A. Hirvonen, "N-Acetyltransferase genotypes as modifiers of diisocyanate exposure-associated asthma risk," *Pharmacogenetics*, vol. 12, no. 3, pp. 227-233, 2002.

[12]. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, "2016 TLVs and BEIs: Based on the documentation of the threshold limit values for chemical substances and physical agents & biological exposure indices," *American Conference of Governmental Industrial Hygienists Cincinnati, OH* , 2016.

[13]. M. Lépine, M. Sleno, J. Segage, and S. Gangé, "A validated LC/MS/MS method for 4,4'-methylenedianiline quantitation in human urine as a measure of 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate exposure," *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* vol. 33, pp. 600-606, 2019.

[14]. M. Lépine, M. Sleno, J. Segage, and S. Gangé, "A validated UPLC-MS/MS method for the determination of aliphatic and aromatic isocyanate exposure in human urine," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 412, no. 3, pp. 753-762, 2019.

[15]. T. D. Li, F. Liu, X. F. Pan, X. Tao, W. Zhao, and H. F. Yan, "Determination of methylenedianiline in urine by high performance liquid chromatography-tandemmass spectrometry," *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi (Chinese Medical Association Publishing House Ltd.),* vol. 36, no. 4, pp. 308-311, 2018.

[16]. D. Bhandari, B. A. Bowman, A. B. Patel, D. M. Chambers, V. R. De Jesús, and B. C. Blount , "UPLC-ESI-MS/MS method for the quantitative measurement of aliphatic diamines, trimethylamine N-oxide, and β-methylamino-l-alanine in human urine," *Journal of Chromatograpy. B, Analytival Technologies in the Biomedical and Life Sciences,* vol. 1083, pp. 86-92, 2018.

[17]. A. Marand, D. Karlsson, M. Dalene, and G. Skarping, "Determination of amines as pentafluoropropionic acid anhydride derivatives in biological samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry," *Analyst*, vol. 129, no. 6, pp. 522-528, 2004.

[18]. S. L. Flack, L. M. Ball, and L. A. Nylander-French, "Occupational exposure to HDI: progress and challenges in biomarker analysis," *Journal of Chromatograpy. B, Analytival Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 878, no. 27, pp. 2635-2642, 2010.

[19]. H. Harari, D. Bello, S. Woskie, and C. Redlich, "Development of an Interception Glove Sampler for Skin Exposures to Aromatic Isocyanates," The *Annals of Occupational Hygiene*, vol. 60, no. 9, pp. 1092-1103, 2016.

[20]. AOAC Official Methods of Analysis, *Appendix F: Guidelines for standard method performance requirements,* 2012.

[21]. Council implementing regulation (EU) 2021/804, *Official Journal of the European Union*, vol. 64, pp. 96, 2021.

Study on the determination of some diamine in urine by LC-MS/MS

Tong Thi Ngan[1,2], Mai Ngọc Thanh[2], Nguyen Thi Hien[2], Pham Thi Quyen[2], Nguyen Phuc Dan[2], Nguyen Thi Huyen[2], Nguyen Thi Minh Hoa[3], Vu Tung Lam[1], Chu Thi Thu Hien[4], Hoang Thi Lan Anh[5], Nguyen Thi Anh Huong[1]

[1]Faculty of Chemistry, University of Science, Vietnam National University, Hanoi, Vietnam

[2]Vietnam National Institute of Occupational Safety and Health, Hanoi, Vietnam

[3]National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam

[4]Department of Chemistry, Faculty of Building Materials, Hanoi University of Civil Engineering (HUCE), Hanoi, Vietnam

[5]Military Institute of Preventive Medicine, Hanoi, Viẻtnam

Abstract

Isocyanate is a common name for chemical compounds containing one or more -NCO groups. There have been many studies showing that isocyanates pose a risk to human health when exposed and can cause occupational poisoning. When absorbed into the body, the isocyanates will be converted into the corresponding amines. Therefore, the determination of these diamines in urine will contribute to the assessment of exposure to isocyanates. This article presents a study on simultaneous determination of 4,4′-methylenedianiline (MDA), hexamethylene diamine (HDA), isophoron diamine (IPDA) in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method detection limit (MDL) were 0.074, 0.059, and 0.053 ng/mL for HDA, MDA, IPDA, respectively. The method quantitation limit (MQL) were 0.243, 0.194 and 0.177 ng/mL for HDA, MDA, IPDA, respectively. The method's recovery ranged from 86.38 to 105.3% with the repeatability RSD_r < 6%. The method was successfully applied to simultaneously determine the content of HDA, MDA and IPDA in 30 urine samples of workers at auto repair garages in Bac Ninh province. The results showed that HDA, MDA and IPDA were detected in these samples with different concentrations.

Keywords: *LC-MS/MS, diamine, MDA, HDA, IPDA, urine.*