

NGHIÊN CỨU PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH TOLUEN TRONG NƯỚC TIÊU BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ KHÍ KHỐI PHỔ KẾT HỢP VỚI KỸ THUẬT KHÔNG GIAN HƠI (HS-GC-MS/MS)

Đến tòa soạn 11-07-2024

Phạm Thị Vân *, Tạ Thị Bình, Nguyễn Thị Huyền, Phùng Thị Thảo, Phạm Văn Tuấn

Viện Sức khỏe nghề nghiệp và môi trường

*Email: phamthivank54b@gmail.com

SUMMARY

DETERMINATION OF TOLUENE IN URINE USING HEADSPACE/ GAS- CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Urinalysis of toluene is important to monitor workers occupationally exposed to toluene as well as in the diagnosis of some diseases related to chronic human exposure. Studies were carried out to establish the best extraction conditions for the method, taking into account the various factors that affect the technique, such as heating time, heating temperature, and the effect of salt addition. This work shows a sensitive, simple, and rapid static headspace-gas chromatographic procedure for the quantitative determination of toluene in urine. The limit of detection for toluene is 0.029 $\mu\text{g/L}$, with a standard deviation of less than 6%. Precisions (%RSD) for toluene at different levels were less than 21%. Recoveries for toluene ranged from 80 to 110%. Determination of Toluene in Urine using Headspace/Gas-Chromatography- Mass Spectrometry has the sensitivity, repeatability, and recovery requirements of AOAC.

Keywords: Toluene, Urine, Headspace/Gas-Chromatography- Mass Spectrometry

1. MỞ ĐẦU

Trong công nghiệp, toluen là một trong những hidrocarbon thơm đơn vòng được sử dụng phổ biến nhất. Toluene được dùng nhiều trong sản xuất công nghiệp như: sản xuất các sản phẩm hoặc đồ nội thất bằng nhựa, vật liệu cách nhiệt, sợi thủy tinh, phụ tùng ô tô, giày dép, sơn, cốc uống nước và các hộp đựng thực phẩm khác...[1]. Sự phơi nhiễm của con người với toluen xảy ra chủ yếu do hít phải toluen trong các ngành sử dụng nhựa, sơn. Con người cũng có thể bị phơi nhiễm khi hít thở khí thải ô tô, khi làm việc với xăng

hoặc dầu, sơn dễ cháy và ngay cả khi hít phải trực tiếp [2,3]. Phơi nhiễm với toluen có thể gây kích ứng mắt, mũi và cổ họng; da khô hoặc nứt nẻ; nhức đầu, chóng mặt, cảm giác say, lú lẫn và lo lắng [4]. Người lao động có thể tiếp xúc với toluen bằng cách hít vào, tiếp xúc với da, bắn vào mắt hoặc nuốt phải. Sự hấp thụ qua da của toluen trực tiếp từ không khí được cho là thấp, chiếm 1–2% tổng trọng lượng cơ thể nhận được sau khi tiếp xúc với hơi toluen [5].

Hiệp hội vệ sinh công nghiệp Mỹ (ACGIH) khuyến nghị sử dụng kết hợp 03

chỉ điểm sinh học để đánh giá mức độ phơi nhiễm của người lao động với toluen: hàm lượng ortho-cresol trong nước tiểu, hàm lượng toluen trong nước tiểu khi kết thúc ca làm việc và hàm lượng toluen trong máu ngay trước ca cuối cùng của một tuần làm việc [6].

Nhiều phương pháp xác định hàm lượng toluen trong mẫu sinh học hiệu quả đã được công bố dựa vào các kỹ thuật khác nhau như sử dụng sắc ký lỏng cao áp kết hợp với đầu dò UV-VIS, sắc ký khí kết hợp với đầu dò ion hóa ngọn lửa (GC-FID) [7]. Đặc biệt mấy năm gần đây kỹ thuật được chú ý nhiều nhất là phương pháp sắc ký khí kết hợp khối phổ với độ nhạy và độ chính xác cao. Khi sử dụng các phương pháp phân tích trên các hệ sắc ký kết hợp khối phổ độ nhạy cao đáp ứng tốt cho việc xác định hàm lượng toluen ở hàm lượng thấp [8]. Phương pháp xác định hàm lượng toluen trong máu với các bước xử lý mẫu đơn giản và phân tích trên hệ thống máy sắc ký khí đầu dò ion hóa ngọn lửa kết hợp không gian hơi (HS-GC/FID) đã được Viện Quốc gia về An toàn Sức khỏe nghề nghiệp của Mỹ ban hành từ năm 2013 với giới hạn phát hiện là 0,006 µg/mL [9]. Liangyuan Zhao và cộng sự đã sử dụng phương pháp này cùng với sắc ký khí khối phổ (GC/MS) để phát hiện BTEX trong máu giúp giảm thiểu ô nhiễm từ các chất khí, ống tiêm dùng một lần và vial với giới hạn phát hiện đối với toluen là 25 pg/mL [10,11].

Hiện nay, tại Việt Nam việc nghiên cứu và phân tích toluen trong mẫu nước tiểu còn chưa phổ biến nhất là việc áp dụng phân tích toluen với phương pháp thân thiện với môi trường. Vì vậy chúng tôi

tiến hành “Nghiên cứu phương pháp phân tích toluen trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ kết hợp với kỹ thuật không gian hơi (HS-GC-MS/MS)” làm tiền đề cho các nghiên cứu quy mô lớn hơn trong đánh giá ảnh hưởng của toluen đến sức khỏe người lao động nói riêng và cộng đồng nói chung.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Thiết bị, dụng cụ và hóa chất

- Máy sắc ký khí khối phổ 3 tứ cực (GC-MS/MS) TQ 9000- Thermo có kết nối bộ không gian hơi headspace Triplus 300, cột DB5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
- Lọ vial headspace 20 mL
- Dung dịch chất chuẩn gốc toluen (≥99%)
- Muối sodium sulfate (Na_2SO_4) (≥99%) (Merck)
- Muối sodium chloride (NaCl) (≥98%) (Merck)
- Nước siêu tinh khiết loại I đã loại bỏ chất hữu cơ bằng máy Millipore MilliQ.

2.2 Quy trình thực hiện

2.2.1 Quy trình lấy và bảo quản mẫu

- Mẫu nước tiểu bãi: thu nước tiểu giữa bãi khoảng 10-20 mL vào lọ lưu mẫu.
- Mẫu được vận chuyển lạnh và được bảo quản trong điều kiện mát trong suốt quá trình vận chuyển. Mẫu giữ ổn định trong vòng 30 ngày ở điều kiện 4 °C [12]

2.2.2. Chuẩn bị mẫu

Lấy chính xác 5 mL dung dịch chuẩn hoặc mẫu cho vào lọ 20 mL dùng cho bộ

không gian hơi Thermo thêm 0,2 g Na_2SO_4 và đóng nắp lại.

2.2.3. Chương trình phân tích trên thiết bị GC-MS/MS

- Nhiệt độ nguồn ion hóa: 250 °C
- Nhiệt độ tứ cực : 200 °C
- Chương trình nhiệt độ : Nhiệt độ 50 °C giữ trong 3 phút, tăng 5 °C/phút đến nhiệt độ 120 °C, tăng 30 °C/phút đến nhiệt độ 250 °C được giữ trong 1 phút [9]
- Nhiệt độ buồng bơm mẫu không gian hơi: 80 °C
- Chế độ đo: SIM
- Toluene trong mẫu được làm nóng trong bộ bơm mẫu không gian hơi và được hóa hơi ở nhiệt độ thích hợp, sau đó được đưa vào cột tách sắc ký khí bằng dòng khí mang heli và di chuyển vào nguồn MS. Dưới tác dụng của nguồn ion hóa điện tử (EI) ở năng lượng tiêu chuẩn 70eV, một chùm electron làm ion hóa phân tử toluene tạo ra các ion có m/z: 65, 91, 92 [13].

2.2.4 Tối ưu hóa điều kiện không gian hơi (headspace)

Tiến hành khảo sát thời gian gia nhiệt, nhiệt độ buồng hóa hơi và ảnh hưởng của các muối trong quá trình phân tích. Các nghiên cứu đã được thực hiện để thiết lập các điều kiện chiết xuất tốt nhất cho phương pháp có tính đến các yếu tố khác nhau có thể ảnh hưởng đến kỹ thuật này. Đối với bước này, các mẫu nước tiểu được chuẩn bị từ nước tiểu gộp của những người khỏe mạnh trong nước tiểu không chứa toluene. Mẫu nước tiểu thu thập được thêm hàm lượng toluene 10 µg/L và được chuyển vào các bình kín thích hợp:

+Thời gian gia nhiệt: 5, 10, 15 và 20 phút được đánh giá;

+Nhiệt độ buồng gia nhiệt: 70, 80, 90 và 95 °C được thử đối với các mẫu được giữ trong lò trong 20 phút;

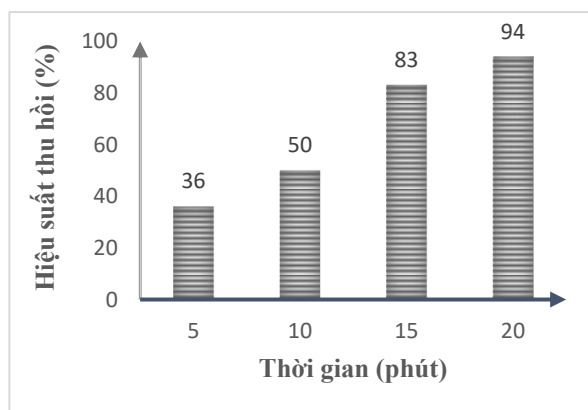
+Ảnh hưởng của việc thêm muối: các mẫu từ nước tiểu gộp được giữ ở 80 °C trong 20 phút và không thêm muối, thêm 0,2 g sodium sulfate khan, thêm 0,2 g sodium chloride;

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả tối ưu hóa điều kiện không gian hơi (headspace)

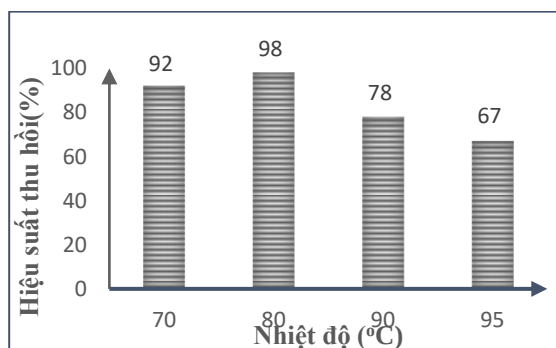
Với mục tiêu tìm điều kiện hóa hơi chất phân tích tốt để tìm được độ thu hồi và độ nhạy cao. Chúng tôi tiến hành khảo sát thời gian gia nhiệt, nhiệt độ buồng hóa hơi và ảnh hưởng của các muối trong quá trình phân tích.

Các kết quả thu được cho thấy thời gian ủ trong hệ thống headspace đã làm hiệu suất thu hồi toluene tăng lên khi thời gian ủ tăng và hiệu suất thu hồi đạt 94% ở thời gian ủ là 20 phút, như vậy có thể thấy thời gian 20 phút được chọn để phân tích vì hiệu suất thu hồi chất phân tích cao.



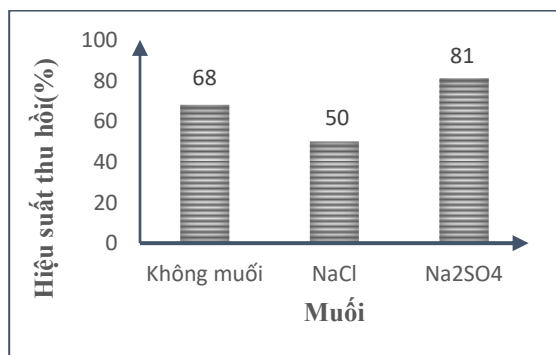
Hình 1: Ảnh hưởng của thời gian ủ lên diện tích pic toluene

Nhiệt độ gia nhiệt được đánh giá để xác định nhiệt độ lý tưởng cho quá trình bay hơi toluen. Nhiệt độ ban đầu là 70 °C, và nhiệt độ cao nhất được sử dụng là 95 °C. Các kết quả ở hình 2 cho thấy hiệu suất thu toluen ở nhiệt độ 80 °C cao nhất 98%. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ lên 90 °C xảy ra hiện tượng bay hơi nước đáng kể, làm suy giảm khả năng phân tích và làm giảm hiệu suất của cột sắc ký.



Hình 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ tới diện tích pic toluen

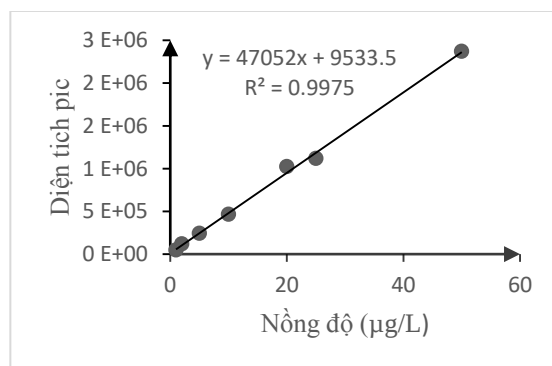
Việc bổ sung muối đã được nghiên cứu để xác định tác dụng của muối trong quá trình chiết chất phân tích. Theo các nghiên cứu trước đó, độ hòa tan của nhiều hợp chất không điện phân bị giảm khi thêm muối do hệ số hoạt độ tăng. Ở đây Na_2SO_4 gây ra hiệu ứng này với độ nhạy cao hơn, với hiệu suất thu hồi đạt 81%.



Hình 3: Ảnh hưởng của muối tới diện tích pic toluen

3.2 Xây dựng đường chuẩn

Từ các điều kiện đã khảo sát tiến hành xây dựng đường chuẩn toluen có nồng độ 1 µg/L, 2 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L. Lấy chính xác 5 mL mẫu chuẩn vào lọ 20 mL dùng cho bộ phận không gian hơi và được thêm 0,2 g Na_2SO_4 sau đó lọ được bịt kín và làm nóng. Tiến hành phân tích theo chế độ đo của sắc ký khí khối phổ với điều kiện không gian hơi ở nhiệt độ ủ là 80 °C và thời gian ủ là 20 phút. Chúng tôi tiến hành xây dựng đường chuẩn và thu được kết quả như sau:



Hình 4: Đường chuẩn toluen

Khoảng tuyến tính của phép đo có phương trình hồi quy $y = 47052x + 9533,5$ với hệ số tương quan $R = 0,9987$ đạt yêu cầu $0,995 \leq R \leq 1$, hệ số xác định $R^2 = 0,9975$ đạt yêu cầu $0,99 \leq R^2 \leq 1$ [14]

3.3 Giới hạn phát hiện và định lượng

Giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp phân tích là hàm lượng chất phân tích trong mẫu có thể phát hiện được. Để xác định LOD – toluen của phương pháp, tiến hành phân tích 7 lần mẫu nước tiểu có nồng độ toluen thấp đã được khảo sát trước.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD};$$

$$LOQ_{LT} = 3*LOD$$

LOD: giới hạn phát hiện.

LOQ_{LT}: giới hạn định lượng lý thuyết.

SD: Độ lệch chuẩn.

Giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp là nồng độ tối thiểu của một chất có trong mẫu thử mà ta có thể định lượng được với kết quả có độ chính xác mong muốn bằng phương pháp đó. Chúng tôi sử dụng thử nghiệm LOQ bằng cách dựa trên độ đúng và độ chụm của phương pháp, do đó LOQ có thể được tính là hàm lượng thấp nhất có thể đạt được yêu cầu độ đúng và độ chụm. Qua các kết quả khảo sát chúng tôi thu được LOD là 0,03 µg/L và LOQ thực tế thu được là 1 µg/L với hệ số biến thiên RSD là 6%.

3.4 Xác định độ chính xác của phương pháp

Việc xác định độ chính xác có thể thực hiện thông qua xác định độ thu hồi của phương pháp đối với toluen, chúng tôi tiến hành phân tích trên mẫu thực và thêm chuẩn toluen vào mẫu thực ở nồng độ 5 µg/L để khảo sát độ thu hồi tại điểm gần với đầu đường chuẩn, thêm chuẩn 25 µg/L để khảo sát nồng độ toluen trong nước tiểu ở khoảng cuối đường chuẩn. Mỗi mức thực hiện 7 lần, kết quả thu được như sau:

Bảng 1: Kết quả khảo sát độ lặp lại và hiệu suất thu hồi của toluen

Tên mẫu	Hàm lượng toluen (µg/L)	R%	RSD%
M	1,95		
M+5 µg/L	100,7	100,7	3,39
M+5 µg/L	103,2	103,2	

Tên mẫu	Hàm lượng toluen (µg/L)	R%	RSD%
M+5 µg/L	100,6	100,6	
M+5 µg/L	96,0	96,0	
M+5 µg/L	89,0	89,0	
M+5 µg/L	96,7	96,7	
M+5 µg/L	99,0	99,0	
M+25 µg/L	86,18	86,18	0,75
M+25 µg/L	85,54	85,54	
M+25 µg/L	86,71	86,71	
M+25 µg/L	84,90	84,90	
M+25 µg/L	86,14	86,14	
M+25 µg/L	85,20	85,20	
M+25 µg/L	84,92	84,92	

Kết quả thử nghiệm độ thu hồi toluen của phương pháp ở nồng độ thêm chuẩn 5 µg/L cho độ thu hồi từ 89-103,2%, trung bình 97,9%, nồng độ thêm chuẩn 25 µg/L cho độ thu hồi từ 84,9-86,71%, trung bình 85,65%. Khảo sát độ thu hồi của phương pháp ở khoảng nồng độ của LOQ cho độ thu hồi R% từ 80,75-95,58% trung bình 87,6%. Theo Hiệp hội các nhà hoá phân tích chính thống (AOAC) cho phép độ thu hồi ở khoảng nồng độ 100 µg/L-1000 µg/L độ thu hồi cho phép là 80-110%, ở khoảng nồng độ 10 µg/L độ thu hồi cho phép là 60-115%. Theo kết quả đạt được, độ lệch chuẩn tương đối RSD của các phép phân tích cao nhất là 3,39%, thấp hơn khoảng RSD chấp nhận được theo yêu cầu của AOAC về đánh giá tiêu chí độ lặp (<21%). Như vậy, quy trình phân tích toluen trong mẫu nước tiểu bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ kết hợp không gian hơi đạt tiêu chuẩn theo AOAC [14].

3.5 Khảo sát độ lặp lại của phương pháp

Tiến hành khảo sát độ lặp lại của phương pháp khi áp dụng trên 2 mẫu thực, mỗi mẫu được phân tích 7 lần thu được kết quả như sau:

Bảng 2: Độ lặp lại của phương pháp

Tên mẫu	Hàm lượng toluen (µg/L)	Hàm lượng trung bình (µg/L)	SD	RSD %
H1	15,28	15,04	0,2	1,33
H2	14,68			
H3	15,12			
H4	14,97			
H5	15,17			
H6	14,94			
H7	15,13			
T1	4,52	4,51	0,06	1,34
T2	4,58			
T3	4,48			
T4	4,62			
T5	4,46			
T6	4,47			
T7	4,48			

Kết quả thử nghiệm độ lặp lại được tiến hành trên 2 mẫu thực cho thấy hàm lượng toluen trung bình trong nước tiểu tương ứng là $4,5 \pm 0,2$ µg/L; $15,04 \pm 0,06$ µg/L, độ lệch chuẩn tương đối tương ứng là 1,34%, 1,33%. Theo Hiệp hội các nhà hoá phân tích chính thống (AOAC) cho phép độ lặp lại tại khoảng nồng độ 100 µg/L là $\leq 15\%$; khoảng nồng độ 10 µg/L là $\leq 21\%$. Kết quả độ lặp lại của phương pháp xác định toluen bằng sắc ký khí khối phổ kết nối không gian hơi đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn của AOAC [14].

4. KẾT LUẬN

Từ quy trình phân tích trên cho thấy phân tích toluen bằng phương pháp HS –GC-MS/MS với các bước xử lý mẫu đơn giản,

không tốn kém, không sử dụng các dung môi làm ô nhiễm môi trường. Nghiên cứu tìm ra các điều kiện tối ưu trong việc phân tích toluen trong nước tiểu bằng phương pháp sắc ký khí khối phổ kết hợp với kỹ thuật không gian hơi (HS-GC-MS/MS) như nhiệt độ ủ, thời gian ủ.... Phương pháp phân tích có độ thu hồi dao động 80-110%, với độ lệch chuẩn RSD < 21% đạt yêu cầu của AOAC để xác định toluen trong nước tiểu.

Cam kết: Tôi cam đoan đây là công trình của nhóm tác giả và chưa gửi đăng nội dung này ở bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] ACGIH (2017) Toxicological profile for toluene. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry, .
- [2] Luigi Perbellini , Francesco Pasini, Serena Romani, Andrea Princivalle, Francesco Brugnone (2022) Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and m-xylene in biological samples from the general population. *Journal of Chromatography B.* **778(1–2)** 199–210.
- [3] Seong-Kyu Kang , Diane S Rohlman, Mi-Young Lee, Hye-Sil Lee, Soo-Young Chung, W Kent Anger (2005) Neurobehavioral performance in workers exposed to toluene. *Environ Toxicol Pharmacol.* **19(3)** 645–650.
- [4] Bộ Y tế (2016) Thông tư số 15/2016/TT-BYT Quy định về bệnh nghề nghiệp được hưởng bảo hiểm xã hội.
- [5] M.J. Prieto, D. Marhuenda, A. Cardona (2002) Analysis of Styrene and its Metabolites in Blood and Urine of Workers Exposed to both Styrene

- and Acetone. *Journal of Analytical Toxicology*. **26 (1)**, 23–28.
- [6] ACGIH (2017) Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. Defining the Science of Occupational and Environmental health.
- [7] Paulo C. F. de Lima Gomes, Éverton D. D’Andrea, Camila B. Mendes and Maria Elisa P. B. de Siqueira (2010) Determination of Benzene, Toluene and N-Hexane in Urine and Blood by Headspace Solid-Phase Microextraction/Gas-Chromatography for the Biomonitoring of Occupational Exposure. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **21 (1)**, 119–126.
- [8] B.M. El-Haj, A.M. Al-Amri, M.H. Hassan, R.K. Bin-Khadem, and A.A. Al-Hadi (2000) A GC-MS Method for the Detection of Toluene and Ethylbenzene in Volatile Substance Abuse. *Journal of Analytical Toxicology*. **24** 390–394.
- [9] NIOSH (2003) Toluene in Blood-method 8007.
- [10] Suramya Waidyanatha , Nathaniel Rothman, Guilan Li, Martyn T Smith, Songnian Yin, Stephen M Rappaport (2004) Rapid determination of six urinary benzene metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects. *Analytical Biochemistry*. **327 (2)**, 184-199.
- [11] Liangyuan Zhao, Xiaojiang Qinb, Xiaomin Hou, Yanhua Li, Kun Zhang, Wei Gong, et al. (2019) Research on determination of BTEX in human whole blood using purge and trap-gas chromatography-mass spectrometry combined with isotope internal standard. *Microchemical Journal*. **145** 308–312.
- [12] Lee C.Stone, James B. Perkins (2012) Toluene in blood: Backup Data Report.
- [13] Yu-dong Jeong, Seunglll Suh, Moon Kyo In, Ki-Jung Paeng, Jin Young Kim (2016) Determination of Toluene and Ethanol in Urine by Headspace and Cryotrapping Gas Chromatography – MASS Spectrometry. *Supertitle: Gas Chromatography*. 1–40.
- [14] Dr. WilWliam Horwitz, George W. Latimer (2006) Official Methods of Analysis of AOAC international. AOAC international, .