

1,2-二氯乙烷接触生物监测指标及检测方法研究

周丽屏 邓燕君 刘移民

【摘要】目的 研究 1,2-二氯乙烷(1,2-DCE)染毒处理大鼠血样中 1,2-DCE 含量与静式染毒柜空气中 1,2-DCE 的剂量-反应关系,探讨人血样中 1,2-DCE 作为接触生物监测指标的可行性,建立人血样中 1,2-DCE 的检测方法。**方法** 使用静态顶空进样器及气相色谱质谱联用仪测定染毒处理大鼠血样中 1,2-DCE 含量,采用 Pearson 相关分析法分析染毒处理大鼠血样中 1,2-DCE 含量与静式染毒柜空气中 1,2-DCE 浓度的关系。取 15 份无接触 1,2-DCE 的正常人血样各 3.0 ml,分别加入 2.0 ml 1,2-DCE 标准应用液后马上密封顶空瓶盖,置于静态顶空装置中 80 °C 加热平衡 20 min,顶空瓶上方蒸汽经毛细管色谱柱分离,选择离子进行定量测定血样中 1,2-DCE,并绘制标准工作曲线。分别在 1 d 及 3 d 内对人血中 1,2-DCE 含量进行 6 次重复测定,计算相对标准偏差,得出方法批内及批间精密度范围。根据 $P = (C_2 - C_0) / C_1 \times 100\%$,计算本方法的加标回收率。**结果** 静式吸入染毒柜内 1,2-DCE 浓度为 1 472、2 550、3 093、3 976 和 4 418 mg/m^3 的剂量组大鼠血样中,1,2-DCE 含量均值分别为 24.1、231.6、344.3、395.1、538.5 $\mu\text{g}/\text{L}$,与 1,2-DCE 剂量呈正相关,剂量-反应关系回归方程为 $y = 0.162x - 195.8$, r 值为 0.982 2, $P = 0.003$,染毒精密度实验的相对标准偏差范围在 7.04% ~ 13.15%。3.0 ml 人血样中 1,2-DCE 在 0.259 ~ 2 587 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性关系良好,总体回归方程为 $y = 47 901x - 357 446$, r 值为 0.999 8。以人血样中 1,2-DCE 质量浓度为 0.259 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的样品检测的 6 次数据计算峰/峰信噪比值均值为 56.55,检出限为 0.014 $\mu\text{g}/\text{L}$,定量限为 0.046 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。批内精密密度为 1.23% ~ 2.76%,批间精密密度为 2.21% ~ 4.64%。3.0 ml 人血样平均加标回收率为 93.3% ~ 98.6%。**结论** 血中 1,2-DCE 可作为接触生物监测指标,静态顶空进样器及气相色谱质谱联用仪测定血中 1,2-DCE 含量灵敏度高、线性范围宽、干扰少、精密密度好、操作简单。

【关键词】 二氯乙烷类; 环境监测; 血液; 静态顶空进样-气相色谱质谱联用法

基金项目:广州市民生科技重大项目(2012Y2-00029-1);广州市卫生局市医药卫生科技项目(20131A011096);广东省“十二五”医学重点专科、广州市医学重点学科建设项目;广州市职业环境与健康效应实验室建设项目(2014SY000020);广州市“121 人才梯队工程”后备人才项目

Study on biological monitoring indicators of exposure to 1,2-dichloroethane and its determination method in blood Zhou Liping*, Deng Yanjun, Liu Yimin.*Evaluation and Testing Center for Occupational Hygiene, The Hospital of Prevention and Treatment for Occupational Diseases, Guangzhou 510620, China

Corresponding author: Liu Yimin, Email: ymliu61@163.com

【Abstract】Objective To investigate the feasibility of using the concentration of 1,2-DCE in blood as a biological monitoring indicators and build the determination method of 1,2-DCE in blood. **Methods** Dose-response relationship of the exposure of 1,2-DCE and the level of 1,2-DCE in rat blood were investigated using the Pearson's correlation analysis. The concentration of 1,2-DCE in blood was determined using Headspace Sampler-Gas Chromatography-Mass Spectrometer (HS-GC-MS). 3.0 ml blood sample diluting with 2.0 ml 1,2-DCE standard serial solution was placed in 15 headspace bottles respectively and heated at 80 °C for 20 min. The vapor upon the headspace bottle was separated by capillary column and the concentration of 1,2-DCE was determined by mass spectrum in SIM mode to draw a standard work curve.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.02.015

作者单位: 510620 广州市职业病防治院职业卫生评价检测中心(周丽屏、刘移民); 中山大学公共卫生学院预防医学系(邓燕君)

通信作者: 刘移民, Email: ymliu61@163.com

The within-run precision and the between-run precision were calculated by the relative standard deviation (RSD) of the concentration of 1,2-DCE in blood which was determined 6 times in a day and 6 times within 3 days respectively. The recovery rate was calculated by $P=(C_2 - C_0)/C_1 \times 100\%$. **Results** When the treatment groups were exposed at dosage of 1 472, 2 550, 3 093, 3 976, and 4 418 mg/m³, the average concentration of 1,2-DCE in rat blood was 24.1, 231.6, 344.3, 395.1, 538.5 μg/L. There was a positive correlation between the concentration of 1,2-DCE in rat blood and the exposed level of 1,2-DCE. The equation of dose-response relationship was $y=0.162x - 195.8$, $r=0.982$, $P=0.003$ and the precision of exposure experiments was 7.04% - 13.15%. 1,2-DCE contents within 0.259 - 2 587 μg/L showed a good linear relationship and the regression equation was $y=47 901x - 357 446$, $r=0.999$. When the blood containing 0.259 μg/L 1,2-DCE was determined for six times, the average peak/peak signal-to-noise ratio was 56.55. The limit of detection (LOD) was 0.014 μg/L and the limit of quantification (LOQ) was 0.046 μg/L. The within-run precision was 1.23% - 2.76% and the between-run precision was 2.21% - 4.64%. The average recovery rate was 93.3% - 98.6%. **Conclusion** The concentration of 1,2-DCE in blood could be used as a biological monitoring indicator. The method of the concentration of 1,2-DCE in blood determining by HS-GC-MS was characterized by high sensitivity, wide linear range, small interference, high precision and easy operation.

【Key words】 Ethylene dichlorides; Environmental monitoring; Blood; HS-GC-MS

Fund program: Guangzhou Science and Technology of People's Livelihood Program (2012Y2-00029-1); Medical Science and Technology Program from Guangzhou Health Bureau (20131A011096); The "Twelfth Five-Year" Medical Discipline priority in Guangdong Province, Medical Key Discipline Construction Program in Guangzhou; The Laboratory Construction of Occupational Environment and Health Effect in Guangzhou (2014SY000020); The Reserve Talents Program of Guangzhou "121 Talents Echelon Project"

1,2-二氯乙烷(1,2-dichloroethane, 1,2-DCE)是一种工业上广泛应用的有机溶剂,常温下为无色、易挥发、具有氯仿气味的油状液体,主要用于生产黏合剂、氯乙烯、三氯乙烷、三氯乙烯和四氯乙烯,清除汽油中的铅,清洁纺织品,制造农药。在农业上可用作粮食与谷物的熏蒸剂、土壤消毒剂等^[1]。1,2-DCE 易燃,属高毒类的神经性毒物,易经呼吸道、消化道和皮肤吸收并快速分布到全身,高浓度接触可引起中毒性脑病,为可疑致癌物^[2]。由于黏合剂在玩具、塑料、箱包皮革、制鞋和家具等行业应用广泛,1,2-DCE 引起的职业中毒事件时有发生^[3-6]。但目前我国尚未制定 1,2-DCE 的生物监测指标及生物接触限值,因此其职业中毒诊断缺乏具有代表性的指标。本研究对染毒处理后的大鼠血样中 1,2-DCE 含量与静式染毒柜空气中 1,2-DCE 的剂量-反应关系进行分析研究,以期探讨人血样中 1,2-DCE 作为接触生物监测指标的可行性,并建立人血样中 1,2-DCE 的检测方法。

材料与方 法

一、材料

1. 实验动物及人血样:(1)实验动物:采用健康无特定病原体(specific pathogen free, SPF)的 6 周龄雄性 SD 大鼠 36 只,体重范围在 180~210 g,由广东省医学实验动物中心提供,检疫合格后对其进行

1 周的适应性喂养。将实验用大鼠称重后以随机数字法分为 6 组:阴性对照组、1,2-DCE 低剂量组(低剂量精密密度实验组)、中剂量组、高剂量组、中剂量精密密度实验组、高剂量精密密度实验组,每组 6 只。(2)人血样:无接触 1,2-DCE 人血样由广州市职业病防治院血液科提供。

2. 仪器与试剂:气相色谱质谱联用仪(6890-5973N,美国 Agilent Technologies 公司);自动顶空进样器(Headspace sampler turbomatrix 40,美国 PerkinElmer 公司);DB-5MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm,美国 Agilent Technologies 公司);超纯水机(Smart 2 Pure,德国 TKA 公司);万分之一天平(AX200,日本岛津公司);静式吸入染毒柜(8050-3A 型,天津合普公司);透明螺纹口顶空瓶(15 ml,德国 CNW 公司);1,2-DCE(纯度≥99.5%,德国 Dr.Ehrensorfer 公司);乌拉坦(纯度≥98%,天津市光复精细化工研究所)。

3.1, 2-DCE 标准储备液:准确称取 1, 2-DCE 0.0194 g 置于 50 ml 容量瓶中,实验用一级水定容,制备得到质量浓度为 0.388 mg/ml 的标准储备液,-4℃保存。临用前稀释成质量浓度为 3 880、1 940、970、776、388、194、77.6、38.8、19.4、11.6、7.76、3.88、1.55、0.776、0.388 μg/L 的标准应用液。

二、实验方法

1. 染毒方法:将大鼠放入静式吸入染毒柜内,选择静式吸入染毒柜内 1, 2-DCE 浓度为 1 472、

2 550 和 4 418 mg/m³ 作为低、中、高剂量组,另选择浓度为 1 472、3 093 和 3 976 mg/m³ 作为低、中、高剂量精密度实验组,每天 6 h,连续染毒 5 d,染毒期间每 30 min 监测一次染毒柜内 1,2-DCE 浓度。染毒柜体积为 60 L,每个染毒柜加入 2 只大鼠,每 2 h 打开染毒柜盖子更换染毒柜内空气,染毒时大鼠禁水禁食。阴性对照组除不加 1,2-DCE 外,其他条件同低、中、高剂量组,染毒期间观察大鼠行为变化。

2. 血样采集和保存:大鼠染毒结束后,观察 8 h,用质量分数为 25% 的乌拉坦 0.5 ml/100 g 腹腔注射麻醉,取腹主动脉血 3 ml 于肝素钠抗凝采血管中。血样密封后于 4 ℃ 冰箱中保存,尽快测定,如需长期保存,则存放于 -20 ℃ 冰箱中。

3. 实验条件:(1)顶空条件:顶空平衡温度 80 ℃;取样针温度 90 ℃;传输线温度 100 ℃;加压时间 2 min;进样时间 0.04 min;拔针时间 0.2 min;恒温平衡时间 20 min;色谱柱压力 15.0 psi;样品瓶压力 15.0 psi。(2)色谱条件:进样口温度 250 ℃;柱温 40 ℃,保持 3 min,再以 20 ℃/min 升到 100 ℃,保持 1 min;以 5:1 的分流比进样,载气使用高纯氦气,柱流量为 0.8 ml/min。(3)质谱条件:离子源为电子轰击源,离子源温度为 230 ℃,辅助接口温度为 280 ℃,电子轰击源电压为 69.9 eV,扫描方式为 SIM, SIM 参数:62.0 质荷比(m/z),质谱调谐设置为自动调谐。

4. SD 大鼠血样中 1,2-DCE 浓度测定:将待检血样充分摇匀,准确移取 3.0 ml 血样于 15 ml 顶空瓶中,加入 2.0 ml 一级水后马上密封顶空瓶盖,按照上述实验条件测定 SD 大鼠血中 1,2-DCE 的浓度。

5. 顶空平衡温度实验:取 15 份无接触 1,2-DCE 的正常人血样各 3.0 ml 分别置于 15 ml 顶空瓶中,分别加入 2 ml 38.8 μg/L 的 1,2-DCE 标准应用液后,马上密封顶空瓶盖,配制成质量浓度为 25.9 μg/L 的平行血样。取其中 8 份分别在 35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃ 条件下平衡 20 min 后进样分析。

6. 恒温平衡时间实验:取上述剩余 7 份血样,分别在顶空平衡温度 80 ℃ 的条件下对样品进行恒温平衡时间为 2、5、8、12、15、20、30 min 的研究,通过恒温时间-峰面积测定数据绘制对应曲线图。在恒温条件下,色谱测定的峰面积基本不变时的最短的时间间隔就是最佳顶空平衡时间。

7. 标准工作曲线绘制:另取 15 份无接触 1,2-DCE 的正常人血样各 3.0 ml,分别置于 15 ml 顶空

瓶中,分别加入 2.0 ml 1,2-DCE 标准应用液后马上密封顶空瓶盖,配制成质量浓度为高(258.7、517.3、646.7、1 293.3、2 586.7 μg/L)、中(7.76、12.9、25.9、51.7、129.3 μg/L)、低(0.00、0.259、0.517、1.034、2.59、5.17 μg/L)3 个标准系列。标准系列血样置于自动顶空进样器中恒温平衡 20 min,进入气相色谱质谱联用仪进行分析,以 SIM 模式扫描,选择采集质荷比为 62.0 的离子,以峰面积的均值对 1,2-DCE 的质量浓度绘制标准曲线。

8. 检出限及定量限:方法检出限根据 $LOD=3 \times Q \times N/I$ (公式 1) 计算所得,定量限根据 $LOQ=10 \times Q \times N/I$ (公式 2) 计算所得,式中 Q 为进样量(μg/L);N 为噪声;I 为信号响应值,I/N 即为该进样量下的信噪比。本实验信噪比值可通过工作站对图谱进行自动分析获得。本研究采用峰/峰信噪比值进行计算,由于信噪比的计算结果与所取的噪声位置、基线长度有很大的关系,为避免信噪比值的计算波动,本研究以血样中 1,2-DCE 质量浓度为 0.259 μg/L 的样品检测的 6 次数据计算信噪比的平均值。

9. 精密度实验:取 72 份无接触 1,2-DCE 的正常人血样各 3.0 ml,分别置于 15 ml 顶空瓶中,把 72 个顶空瓶分成 6 组,每组 12 瓶,各组中分别加入 2.0 ml 1.55、19.4、38.8、77.6、388 和 1 940 μg/L 1,2-DCE 标准应用液,配制成加标质量浓度分别为 1.03、12.9、25.9、51.7、259 和 1 293 μg/L 的样品。在 1 d 内进行 6 次重复测定,计算相对标准偏差,作为方法批内精密度;在 3 d 内进行 6 次重复测定,计算相对标准偏差,作为方法批间精密度。

10. 加标回收实验:另取 36 份无接触 1,2-DCE 的正常人血样各 3.0 ml,分别置于 15 ml 顶空瓶中,把 36 个顶空瓶分成 6 组,每组 6 瓶,各组中分别加入 2.0 ml 1.55、19.4、38.8、77.6、388 和 1 940 μg/L 1,2-DCE 标准应用液,配制成加标质量浓度分别为 1.03、12.9、25.9、51.7、259 和 1 293 μg/L 的样品。加标回收率根据 $P=(C_2 - C_0)/C_1 \times 100\%$ 计算所得,式中 C_0 为空白人血样中 1,2-DCE 的浓度(μg/L); C_1 为加标浓度(μg/L); C_2 为加标血样中 1,2-DCE 的浓度(μg/L)。

三、统计学分析

数据录入采用 Excel 2003 软件,核对无误后导入 Origin Pro 8.0 软件进行统计分析。采用 Pearson 相关分析法分析染毒处理大鼠血液样中 1,2-DCE 含量与静式染毒柜中 1,2-DCE 浓度的关系。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、剂量-反应关系

染毒柜中 1,2-DCE 浓度为 1 472、2 550、3 093、3 976、4 417 mg/m³ 所对应的大鼠血样中 1,2-DCE 含量均值分别为 24.1、231.6、344.3、395.1、538.5 μg/L。Pearson 相关分析结果显示,剂量-反应关系回归方程为 $y=0.162x-195.8$, $r=0.9822$, $P=0.003$ 。提示,SD 大鼠血样中 1,2-DCE 含量与染毒剂量呈正相关关系。染毒精密度实验结果显示,低剂量精密度实验组大鼠血中 1,2-DCE 含量的相对标准偏差为 13.15%;中剂量精密度实验组大鼠血中 1,2-DCE 含量的相对标准偏差为 9.99%;高剂量精密度实验组大鼠血中 1,2-DCE 含量的相对标准偏差为 7.04%。相对标准偏差范围在 7.04%~13.15%,可见染毒实验重现性较好。

二、无接触 1,2-DCE 人血样顶空处理结果

1. 血样预处理结果:本研究显示,3.0 ml 血样加入 2.0 ml 水时实验结果较佳,此时样品总量占整个顶空瓶的 35% 空间(最佳推荐用量),样品黏度适中,不易受热变性凝固。

2. 顶空平衡温度:如图 1 所示,在温度较低时,1,2-DCE 的响应值较低,在 35~80 °C 之间,随着温度的升高,1,2-DCE 的峰面积不断增大,检测灵敏度不断提高,因此本研究采用 80 °C 作为最佳平衡温度。

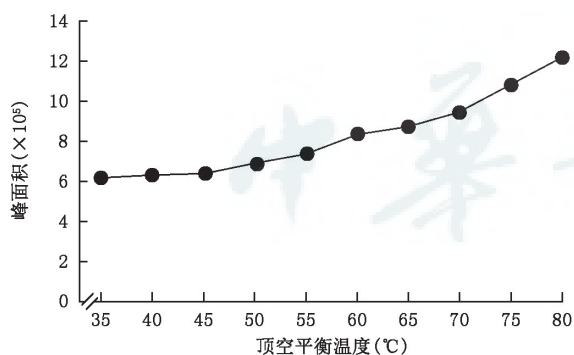


图 1 平衡温度-峰面积关系曲线

3. 恒温平衡时间:如图 2 所示,当恒温平衡时间为 15 min 时,1,2-DCE 峰面积变化趋于平缓,在 20 min 后,顶空瓶中血样与顶空瓶上方气体达到平衡,因此最佳恒温平衡时间为 20 min。

三、线性范围及检出限

工作曲线在高、中、低 3 个标准系列中均有良好线性关系,详见表 1。方法信噪比值均值为

表 1 人血样中 1,2-DCE 线性范围、回归方程、相关系数 (n=3)

线性范围(μg/L)	回归方程	r 值
0.259~5.17	$y=36\ 046x+4\ 154$	0.999 5
5.17~129	$y=45\ 900x-100\ 426$	0.999 8
129~2 587	$y=48\ 495x-1\ 359\ 514$	0.999 8
0.259~2 587	$y=47\ 901x-357\ 446$	0.999 8

注:1,2-DCE:1,2-二氯乙烷

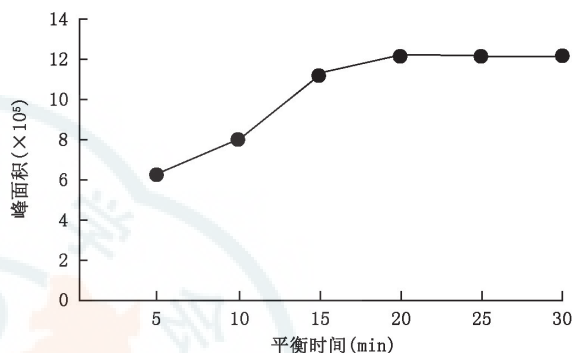


图 2 平衡时间-峰面积关系曲线

56.55,代入公式 1,计算得出方法检出限为 0.014 μg/L,代入公式 2 计算得出定量限为 0.046 μg/L。

四、精密度、加标回收率实验结果

方法批内精密度范围为 1.23%~2.76%,批间精密度范围为 2.21%~4.64%。本方法的平均加标回收率范围为 93.3%~98.6%。详见表 2。

表 2 方法的精密度、加标回收率实验结果 (n=6)

人血样浓度 (μg/L)	批内精密度 (%)	批间精密度 (%)	6 次检测平均值	平均加标回收率 (%)
1.03	1.71	2.35	0.967 5	93.9
12.9	1.23	2.21	12.03	93.3
25.9	2.76	3.56	24.85	95.9
51.7	2.20	4.64	50.88	98.4
259	2.52	3.96	253.4	97.8
1 293	2.46	2.98	1 274.3	98.6

讨 论

虽然已有 1,2-DCE 接触者尿液中生物指标监测的研究报道^[7],但由于暴露组的尿样中多出现硫代二乙酸二甲酯、2-甲硫基乙酸甲酯、磷酸三甲酯等多种组分,没有唯一性及明显的特异性,因此尿中代谢物作为 1,2-DCE 接触生物标志物的研究仍需进行大量的实验和研究探索,而本研究选择血中 1,2-DCE 作为接触生物监测指标具有唯一性。本研究通过动物染毒实验证实,大鼠从呼吸道吸入 1,2-DCE 能通过循环进入体内血液系统,染毒大鼠

血液中 1,2-DCE 浓度与染毒剂量呈正相关关系,且染毒实验重现性较好,提示血中 1,2-DCE 可作为接触生物监测指标之一。

静态顶空技术是将样品置入一密闭容器中,通过加热使挥发性组分与样品基体达到气液(或气固)两相平衡,其顶部气体在一定的条件下成分相对固定^[8]。本研究材料为血样,由于血样中其他挥发性物质较少,而待测物 1,2-DCE 是易挥发有机物,能满足静态顶空的样品要求。根据谢玉璇等^[9]报道的气相色谱-质谱法测定血中 1,2-DCE 的检测方法,其顶空温度在 30~60℃时,样品峰面积随平衡温度增加而增加,60℃后响应值不升反降,其原因就是因为血液本身凝固。因此,本研究在对血样进行前处理时,以 3.0 ml 血样加入 2.0 ml 水为最佳条件,避免血液在较高温度下变性凝固。

从平衡温度-峰面积关系曲线来看,顶空体系温度升高可提高检测灵敏度,但当温度升高,顶空瓶内压力增大,容易导致取样时垫片周围漏气,体系容易出现沸腾现象,破坏了体系两相平衡,从而导致重现性变差。其次,当平衡温度较高时,顶空瓶内水蒸汽较多,进入 DB-5MS 色谱柱后,容易造成较大的柱流失,降低柱效,缩短色谱柱寿命。

由于本方法采用质谱 SIM 模式进行定量分析,样品干扰少,峰面积从 $10^5 \sim 10^{12}$ 时均有较好的峰形,因此本方法线性范围较宽,可达 5~6 个数量级,但考虑到一般人群中接触 1,2-DCE 的浓度较低,时间较短,除部分急性中毒患者外,一般接触人群关注较低浓度范围。因此本方法工作曲线范围可根据具体样品的浓度水平确定。

本研究采用静态顶空进样-气相色谱质谱联用法测定血中 1,2-DCE 含量,得到批内和批间精密度均 <5.0%,此实验的良好精密度是建立在顶空装置的良好性能基础上的。该方法对仪器设备要求较高,若无全自动顶空装置,很难实现方法的高灵敏度、良好线性及良好重现性。

参 考 文 献

- [1] Gwinn MR, Johns DO, Bateson TF, et al. A review of the genotoxicity of 1,2-dichloroethane (EDC)[J]. *Mutat Res*, 2011, 727(1-2): 42-53. DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.01.001.
- [2] 蔡志斌,张英,郑志伟.自动顶空-气相色谱质谱联用技术测定化工原料中 1,2-二氯乙烷[J].*中国卫生检验杂志*, 2013, 23(3): 622-624.
- [3] 王德明,林炳杰.某玩具厂一起二氯乙烷中毒事故的调查报告[J].*中国公共卫生管理*, 2001, 17(6): 525-526.
- [4] 吴子俊,林凯平.一起职业性急性 1,2-二氯乙烷中毒的调查报告[J].*中国职业医学*, 2004, 31(4): 70.
- [5] 李勇勤,谢秀红,曾文锋,等.某皮革厂一起急性 1,2-二氯乙烷中毒事故调查[J].*现代预防医学*, 2010, 37(19): 3621-3622.
- [6] 张海宏,周海林,陈坚,等.一起木质家具生产企业 1,2-二氯乙烷中毒事故调查[J].*职业卫生与应急救援*, 2014, 32(4): 245-246.
- [7] 刘诚,彭小雪,赖璟琦.1,2-二氯乙烷接触者尿液中生物指标监测的研究[J].*中国卫生检验杂志*, 2015, 25(2): 269-270.
- [8] 叶能权,童映芳,陈利平,等.顶空气相色谱法测定尿中甲基异丁基甲酮[J].*中华预防医学杂志*, 2002, 36(5): 339-340.
- [9] 谢玉璇,刘奋,李添娣,等.气相色谱-质谱法测定血中 1,2-二氯乙烷[J].*中国职业医学*, 2014, 41(4): 455-458. DOI: 10.11763/j.issn.2095-2619.2014.04.022.

(收稿日期:2015-03-09)

(本文编辑:燕纪法 吕相征)

中 华 预 防 医 学 杂 志