

文章编号: 1006-3617(2013)11-0829-05

中图分类号: R115

文献标志码: A

【论著】

血清中酞酸酯类浓度与肾透析的相关性

李欣¹, 厉曙光², 李新华³, 于永春³, 张志强⁴, 李明珠¹

摘要: [目的] 了解肾透析人群体内酞酸酯类的暴露情况。[方法] 对某三级甲等医院肾内科透析室就医的 52 名肾透析病人发放调查问卷, 对其肾透析情况进行调查并对回收表进行有效性判断, 同时使用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 测定血清样本中酞酸二丁酯 (DBP) 和酞酸二辛酯 (DEHP) 水平。[结果] 经肾透析管回流入体的静脉血中, 52 份血样均检出 DBP 和 DEHP, 检出率为 100%, DBP 检出浓度低于 DEHP; 男、女血清 DBP 浓度差异无统计学意义, 女性 DEHP 浓度高于男性; 每次透析的时长与肾透析病人血清 DBP 浓度无相关性, 但与 DEHP 的浓度相关; 每周不同透析次数病人血清 DBP 和 DEHP 的检出浓度差异无统计学意义; 每周透析 6 h 的患者共 49 人, 占所有肾透析人数的 94.23%; 透析年限与肾透析病人血清 DBP、DEHP 浓度无相关性。[结论] DEHP 浓度与肾透析病人的性别、每次透析时长相关; DBP 则与病人透析情况无关。

关键词: DBP; DEHP; 血液透析; 肾病

Association of Serum Phthalate Concentrations with Kidney Hemodialysis LI Xin¹, LI Shu-guang², LI Xin-hua³, YU Yong-chun³, ZHANG Zhi-qiang⁴, LI Ming-zhu¹ (1. Department of Prevention and Treatment of Chronic Disease, Baoshan District Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 201901, China; 2. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072, China; 4. School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200432, China). Address correspondence to LI Shu-guang, E-mail: leeshuguang@fudan.edu.cn • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study phthalate exposure levels in kidney hemodialysis patients. [Methods] Dialysis information were collected from 52 patients with kidney hemodialysis treatment in a third-grade-first-class hospital by questionnaires. Concentrations of dibutyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in serum samples were measured by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). [Results] Both DBP and DEHP were detected in the serum samples of 52 nephropathy patients (positive rates, 100%), and the average concentration of DBP was lower than that of DEHP. The DBP concentrations showed no statistical differences between genders, but the average DEHP concentration was higher in female than in male. The single duration of hemodialysis was associated with the DEHP concentrations, but not with the DBP concentrations. No statistical differences in the DBP and the DEHP concentrations were found among patients identified by hemodialysis frequency. Forty-nine patients spent more than 6 h for hemodialysis per week, accounting for 94.23% of total kidney hemodialysis patients interviewed. The hemodialysis years were not associated with either the DBP or the DEHP concentrations in serum. [Conclusion] Serum DEHP concentrations in hemodialysis patients are associated with gender and duration of hemodialysis; while DBP concentrations present no association with kidney dialysis.

Key Words: DBP; DEHP; hemodialysis; nephropathy

酞酸二乙基乙基酯 [di(2-ethylhexyl phthalate, DEHP, 分子量 390; 结构式: C₂₄H₃₈O₄)] 和酞酸二丁酯 (di-n-butyl phthalate, DBP, 分子量 278; 结构

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 81172673)

[作者简介] 李欣(1981—), 女, 硕士, 主管医师; 研究方向: 营养与食品卫生学; E-mail: 10001948@qq.com

[通信作者] 厉曙光教授, E-mail: leeshuguang@fudan.edu.cn

[作者单位] 1. 宝山区疾病预防控制中心慢性病防治科, 上海 201901; 2. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032; 3. 上海市第十人民医院, 上海 200072; 4. 同济大学医学院, 上海 200432

式: C₁₆H₂₂O₄) 是塑料工业常用的增塑剂。酞酸酯类 (phthalic acid esters, PAEs) 易从塑料中游离, 具有亲脂特性。酞酸酯类在肝脏代谢, 产物经肾脏排出^[1]。肾透析人群血液中酞酸酯类浓度的测定在国内鲜有报道。国外利用牛血进行体外实验观察 DEHP 在透析过程中从 PVC 管中析出的情况, 发现随时间的延长 DEHP 析出量增加^[2], 提示有必要研究增塑剂在病人透析过程中的析出量。本实验旨在了解肾透析人群体内酞酸酯类的析出量, 结合其透析过程特征对透析病

人体内污染情况进行初步评估和研究。

1 对象与方法

1.1 调查对象及采样

入选标准：同济大学附属上海市第十人民医院肾内科所有进行维持性血液透析肾病患者。发出调查表56份，回收52份，回收率92.86%。其中，男性23名，女性29名。年龄为40岁以下者2名（分别为28和38岁），40~岁者7名，50~岁者17名，60~岁者11名，70~岁者12名，80岁以上者3名。按照问卷编码1~52对52例肾病患者经透析管回流入体内的静脉血样本进行编号，经10 000 r/min（离心半径3 cm）的低速离心后提取约1.5 mL血清备用^[3~5]。

1.2 调查问卷

调查问卷内容包括：一般情况（姓名、性别、年龄、身高、体重、肾病史）、透析方式、每周透析的情况（次数和时间）、透析的年限及知情同意书等。

对回收调查表进行有效性判断，剔除标准：签署的知情同意书有缺项，相关选项之间的关系存在逻辑矛盾和（或）导致回答违背常理。回收问卷52份，有效问卷52份，有效率为100%。

1.3 仪器与试剂

HP5890GC-HP5972MS气相色谱-质谱联用仪（美国惠普公司）；TGML-16G高速冷冻离心机（上海安亭科学仪器厂）；TJ-360超声波发生器（无锡雷士超声波设备有限公司）；DHG鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）。以正己烷为溶剂配制1 g/L DBP与DEHP混合标准储备液。DBP、DEHP、正己烷，均购自中国医药集团上海化学试剂公司。试剂均为分析纯并经蒸馏纯化。

1.4 分析条件及测定方式

载气：He；流量：0.8 mL/min；色谱柱：HP-5 MS毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm）；进样方式：自动，不分流；进样量：1 μL；进样口温度：280℃；检测器温度：300℃；柱温程序：采用程序升温法，初温150℃，2 min后以15℃/min升温至300℃，保持4 min。离子化方式：EI；离子化能量：70 eV；离子化电流：300 μA；光电倍增管电压：1905 V。

因本次试验仅测定DBP、DEHP，为避免样品中其他组分的干扰并提高灵敏度，采用GC-MS的选择离子检测方法（selected ion monitoring, SIM）。在SIM模式下，监测器只监测选定质核比的离子，在相同扫描

周期内，用以监测该范围的离子的时间更多，比全扫描（full scan）模式灵敏度约提高5~100倍，使采集的灵敏度和重现性达到最优。根据NBS75K谱库，选择峰值质荷比（m/z）149作为监测离子^[6]。

1.5 样品预处理

取300 μL血清，加入0.8 mL正己烷，旋涡震荡器上剧烈震荡3~5 min后，以10 000 r/min（离心半径3 cm）、4℃离心8 min，取上层正己烷层，按上述步骤重复操作3次，合并3次正己烷层定容至3 mL，经微孔滤膜（采用超滤膜，可透过膜孔径在0.05~1 000 μm）过滤后转入GC-MS专用样品管加盖密封保存^[6]。由于PAEs的广泛存在，为避免玻璃器皿表面的污染，全部实验用玻璃器皿均用超声波仔细清洗后，再以蒸馏水冲洗，放入100℃烘箱中烘干。使用前用正己烷淋洗2次。本实验杜绝使用塑料制品。

1.6 定性分析

用DBP、DEHP标准储备液配制10、50、100、1 000、5 000、10 000 μg/L的系列标准溶液，自动进样量为每次1 μL，得进样质量为： 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 1×10^{-2} μg。反复测定6次，记录DBP、DEHP各自的标准溶液流出峰面积。用DBP、DEHP单标和混合标样测定各自的保留时间，样本的定性分析采用与标样的保留时间相对照的方法进行。

1.7 定量分析

样本处理后进行色谱分析，所得的峰面积与标准曲线相比较，通过计算得出样品中含该种PAEs的实际浓度。

1.8 统计分析

采用SPSS 16.0统计软件包中的Kruskal-Wallis法秩和检验与Spearman相关分析进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 标准曲线、回收率和精密度

以峰面积的对数（Y）对进样质量的对数（X）绘制标准曲线并计算线性回归方程。DBP的回归方程为： $Y=1.3713X-9.1859$ ，回归系数 $R=0.9986$ （ $P<0.01$ ）；DEHP的回归方程为： $Y=1.4289X-9.4565$ ，回归系数 $R=0.9970$ （ $P<0.01$ ）。本方法检出限为10 μg/L，测定下限为100 μg/L。

为保证试验数据的准确度，对所用溶剂正己烷进行本底空白扣除。对6份空白血清进行加标回

收试验, 其回收率DBP为95.9%~107.4%, DEHP为93.1%~106.0%; 重复测定100 μg/L的DBP、DEHP混合标准溶液6次, 变异系数(CV)分别为3.08%和2.91%。DBP、DEHP保留时间见图1, 保留时间分别是6.40 min和9.30 min。

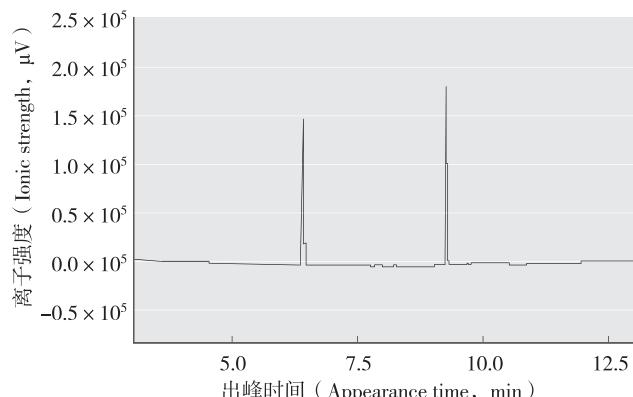


图1 样品中DBP、DEHP的特征离子色谱

Figure 1 Characteristic ion mass spectrum of DBP and DEHP in the samples

2.2 男、女血清DBP、DEHP浓度

由表1可见, 52份肾脏病人的经肾透析管回流入体的静脉血中, 均有DBP和DEHP检出, 检出率为100%。男、女血清DBP的浓度均低于DEHP ($P=0.002$)。女性血清中DBP的检出浓度与男性相比, 差异无统计学意义($P>0.05$); 女性血清中DEHP检出浓度高于男性($P=0.036$)。

表1 男、女肾透析病人血清DBP、DEHP浓度(×10³ μg/L)

Table 1 Association between DBP & DEHP concentrations and gender

性别 Gender	样本数 <i>n</i>	DBP		DEHP	
		浓度范围 Range	平均浓度($\bar{x} \pm s$) Average concentration	浓度范围 Range	中位浓度 [Median (P_{25}, P_{75})] Median concentration
男 Male	23	0.74~1.22	1.09 ± 0.10	1.67~6.18	3.12(3.51, 4.64)
女 Female	29	0.90~1.26	1.07 ± 0.15	0.86~22.05	15.71(2.76, 20.59)*
合计 Total	52	0.74~1.26	1.08 ± 0.12	0.86~22.05	3.90(3.01, 15.71)

[注]*: 与男性组比较(Compared with male), $P=0.036$ 。

2.3 血清中DBP、DEHP的检出浓度与每次透析时间的相关性

由表2可见, 虽然每次透析时长不同, 但病人血清中DBP的检出浓度均低于DEHP; 每次透析的时长与肾透析病人血清DBP浓度无相关性($r_s=0.122$, $P=0.38$), 与DEHP的浓度呈正相关($r_s=0.284$, $P=0.041$)。

2.4 每周不同透析次数病人血清DBP、DEHP浓度

由表3可见, 每周透析次数和每周透析时间不同的肾透析病人, 其血清DBP的检出浓度均低于DEHP; 每周不同透析次数和透析时间所测患者血清DBP和DEHP检出浓度各自相互比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。每周透析时间为6 h的患者共49人, 占所有透析人数的94.23%。

表2 不同透析时长病人血清DBP、DEHP浓度(×10³ μg/L)

Table 2 Serum concentrations of DBP & DEHP in patients with different durations of kidney hemodialysis

每次透析时长(h) Duration of a single hemodialysis	样本数 <i>n</i>	比例(%) Percentage	DBP		DEHP	
			浓度范围 Range	平均浓度($\bar{x} \pm s$) Average concentration	浓度范围 Range	中位浓度(P_{25}, P_{75}) Median concentration
2	27	51.92	0.74~1.24	1.06 ± 0.14	0.86~4.75	3.37(2.78, 3.81)
3	24	46.15	0.90~1.26	1.10 ± 0.11	1.67~22.05	5.34(3.31, 20.59)
4	1	1.92	1.06~1.06	1.06	4.64~4.64	—
合计(Total)	52	100.00	0.74~1.26	1.08 ± 0.12	0.86~22.05	3.90(3.01, 15.71)

表3 每周不同透析次数病人血清DBP、DEHP浓度(×10³ μg/L)

Table 3 Serum concentrations of DBP & DEHP in patients with different frequency of hemodialysis per week

每周透析次数 Hemodialysis frequency/week	样本数 <i>n</i>	比例(%) Percentage	DBP		DEHP	
			浓度范围 Range	平均浓度($\bar{x} \pm s$) Average concentration	浓度范围 Range	中位浓度(P_{25}, P_{75}) Median concentration
1	1	1.92	1.10~1.10	1.10	6.18	—
2	23	44.23	0.90~1.26	1.09 ± 0.11	1.67~20.59	4.64(3.17, 15.71)
3	28	53.85	0.74~1.24	1.10 ± 0.14	0.86~22.05	3.51(3.91, 4.75)
合计(Total)	52	100.00	0.74~1.26	1.08 ± 0.12	0.86~22.05	3.90(3.01, 15.71)

2.5 血清DBP、DEHP浓度与透析年限的相关性

由表4可见,不同透析年限的肾透析病人,其血清中DBP的检出浓度均低于DEHP;透析年限与肾透

析病人血清中的DBP($r_s=-0.161$, $P=0.255$)、DEHP浓度无相关性($r_s=0.042$, $P=0.769$)。

表4 不同透析年限病人血清DBP、DEHP浓度(×10³μg/L)

Table 4 Serum concentrations of DBP & DEHP in patients with different hemodialysis years

年限(年) Hemodialysis (Years)	样本数 <i>n</i>	比例(%) Percentage	DBP		DEHP	
			浓度范围 Range	平均浓度($\bar{x} \pm s$) Average concentration	浓度范围 Range	中位浓度(P_{25}, P_{75}) Median concentration
<1	12	23.08	0.93~1.22	1.11 ± 0.11	2.46~20.59	4.56(3.17, 20.59)
1~	24	46.15	0.74~1.26	1.08 ± 0.13	0.86~15.71	3.56(3.01, 4.64)
3~	10	19.23	0.79~1.17	1.05 ± 0.12	1.67~4.14	2.84(2.11, 3.68)
5~10	6	11.54	0.90~1.22	1.06 ± 0.13	2.67~22.05	20.05(4.31, 22.05)
合计(Total)	52	100.00	0.74~1.26	1.08 ± 0.12	0.86~22.05	3.90(3.01, 15.71)

2.6 血清DBP、DEHP浓度与总透析时间的相关性

总透析时间为透析年限与每周透析次数和时间长度的乘积。由表5可见,7个不同透析年限患者的血

清DBP检出浓度均低于DEHP;总透析时间与各组病人血清中的DBP($r_s=-0.103$, $P=0.468$)、DEHP的浓度无相关性($r_s=0.199$, $P=0.156$)。

表5 不同总透析时间病人血清DBP、DEHP浓度(×10³μg/L)

Table 5 Serum concentrations of DBP & DEHP in patients with different total hemodialysis hours

总透析时间(h) Total hemodialysis hours	样本数 <i>n</i>	比例(%) Percentage	DBP		DEHP	
			浓度范围 Range	平均浓度($\bar{x} \pm s$) Average concentration	浓度范围 Range	中位浓度(P_{25}, P_{75}) Median concentration
0~	12	23.07	0.93~1.22	1.12 ± 0.11	2.46~20.59	4.56(3.17, 20.59)
300~	23	44.23	0.74~1.26	1.08 ± 0.14	0.86~15.71	3.51(3.01, 4.68)
600~	11	21.15	0.79~1.17	1.05 ± 0.12	1.67~4.64	3.08(2.29, 4.14)
900~1900	6	11.55	0.90~1.22	1.06 ± 0.19	2.67~22.05	4.31(2.92, 22.05)
合计(Total)	52	100.00	0.74~1.26	1.08 ± 0.12	0.86~22.05	3.90(3.01, 15.71)

3 讨论

塑料制品已经被广泛应用于医疗领域中,其中25%是聚氯乙烯(PVC)制品,主要用于制作输液袋、试管、血液或血浆袋、导尿管和手套等^[5]。酞酸酯类可通过使用PVC等医疗用具和贮存在PVC袋中的血浆、静脉注射液直接进入人体,塑料中酞酸酯类的浓度越高,可被溶出的酞酸酯类浓度就越大。DBP、DEHP在人体内的正常浓度尚未设定国家标准,缺少本底值。DBP、DEHP等酞酸酯的人群调查国外已有报道,但基本都是对尿液中降解产物的定量分析。由于缺乏人体代谢动力学数据,测定结果易受到人体代谢的影响和个体差异的干扰,如肝肾功能等。而测定肾脏病人经透析管回流入体的静脉血中酞酸酯的浓度可以避免代谢中不确定因素,更直接地反映人体近期的酞酸酯暴露水平。HAISHIMA等^[2]利用牛血进行体外实验,观察DEHP在透析过程中从PVC管中析出的情况,发现随时间的延长DEHP的析出量增加,血中浓度分别在0(对照)、30、60、120、240 min时达

到(248.9 ± 123.6)、(441.4 ± 55.5)、(606.2 ± 28.4)、(949.9 ± 85.3)、(1717.8 ± 147.4)mg/m³。牛血与人血虽不具有可比性,但提示在血透过程中,所用PVC管中DEHP可能进入患者体内。HAUSER等^[7]收集血透患者的透析流出液、尿液和血液,分析DEHP的代谢成分,在这三种物质中均可检测到DEHP及其代谢产物MEHP、酞酸(PA)和2-乙基己醇(2-EH)。本次试验所做人群均不是第一次进行透析,只能对透析以后的PAES水平进行测定,与正常人群比较测定值明显偏高^[3]。直接测定肾透析患者经透析管回流入体内的静脉血样本中的DBP、DEHP,检出率为100%,其原因可能是由于DBP、DEHP均为小分子物质,可以透过半透膜由血液中顺浓度差弥散和渗透进入透析液中。但另一个影响因素则是肾透析病人的排泄功能较差,使得酞酸酯类不易排出体外,造成血清中的酞酸酯类浓度偏高,有待后期研究证实。

DBP、DEHP等酞酸酯是已确认的环境雌激素,对生物体有一定的拟雌激素作用以及亚急性、慢性毒

性。酞酸酯对肾脏的损伤表现为肾功能下降, 病灶性肾囊肿数量增加; 有肾小管色素沉着发生, 其严重程度随 DEHP 剂量的增加而增加。有些研究发现血液透析病人中肾囊肿发生率显著升高, 可能是病人透析接触较大剂量 DEHP 的缘故^[8-11]。本次试验中, DBP 的检出浓度低于 DEHP。这可能与透析管中增塑剂使用的种类和数量有很大关系。

从具体透析情况分析, 每周透析次数、每周透析时间、每次透析时间、透析年限及总透析年限是可能影响肾透析病人血清 DBP、DEHP 含量的因素。由研究结果可见, 每周透析次数越多、透析年限越长, 血透对患者血清 DBP、DEHP 的清除力越强。但每次和每周透析的时间越长, 反而会增加血清 DEHP 的含量, 这可能由于增塑剂与血液接触在一定时间内, 及与脂类大分子结合的机会, 使增塑剂不易被血透清除。提示根据患者具体情况, 可以适当增加每周透析次数, 缩短每次透析时间, 可能是降低维持性血透患者体内增塑剂含量的有效途径。当然, 这还需进一步扩大样本量来证实这一推论。

本次研究采用的测定仪器具有检出限低、精确度高、线性范围广等优点, 可以完全满足血清微量分析的要求, 测试中采用 10 000 r/min(离心半径 3 cm) 的转速低温高速离心措施, 对前处理样本进行辅助提取, 有效地去除了样品中残留的多肽和蛋白质等极性干扰物, 使毛细管柱免受其破坏及对质谱离子源的污染, 保证了在整个分析过程具有较小的仪器背噪和较高的柱效。这对难处理的血清样品是一个很好的前处理方法^[11]。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 张蕴晖, 林玲, 阚海东, 等. 邻苯二甲酸二丁酯的人群综合暴露评估 [J]. 中国环境科学, 2007, 27(5): 651-656.
- [2] HAISHIMA Y, MATSUDA R, HAYASHI Y, et al. Risk assessment of di(2-ethylhexyl) phthalate released from PVC blood circuits during hemodialysis and pump-oxygenation therapy. Int J Pharm, 2004, 274(1-2): 119-129.
- [3] 陈科, 厉曙光, 张志强. 420 名大学生血清酞酸酯水平及其与性激素的关系研究 [J]. 环境与职业医学, 2009, 26(3): 232-234.
- [4] 李欣, 厉曙光, 张志强. 不同加热方式和包装材料对食品中酞酸酯类含量的影响 [J]. 环境与职业医学, 2009, 26(3): 228-231.
- [5] 于晓楠, 厉曙光, 李欣, 等. 一次性输液器种酞酸酯类增塑剂溶出和微粒脱落、滤出的研究 [J]. 上海医学, 2008, 31(3): 191-194.
- [6] 蔡智鸣, 史馨, 张前龙, 等. GC-MS 测定人血清中酞酸酯类环境污染物 [J]. 理化检验化学分册, 2006, 42(2): 115-119.
- [7] HAUSER R, MEEKER JD, DUTY S, et al. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites [J]. Epidemiology, 2006, 17(6): 682-691.
- [8] 张蕴晖, 陈秉衡, 郑力行, 等. 人体生物样品中邻苯二甲酸酯类的含量 [J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37(6): 429-434.
- [9] PANT N, SHUKLA M, KUMAR PATEL D, et al. Correlation of phthalate exposures with semen quality [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 231(1): 112-116.
- [10] DUTY S M, CALAFAT A M, SILVA M J, et al. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men [J]. Hum Reprod, 2005, 20(3): 604-610.
- [11] WOODWARD K N. Phthalate ester, cystic kidney disease in animals and possible effects on human health: a review [J]. Hum Exp Topical, 1990, 9(6): 397-401.

(收稿日期: 2012-12-27)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 丁瑾瑜)