

固相萃取-气相色谱法测定血中氯丁二烯的方法研究

王超洋, 秦文华

摘要: [目的] 建立血样中氯丁二烯的固相萃取-气相色谱测定方法。[方法] 血样中的氯丁二烯经 C18 小柱富集, 用甲醇洗脱, 洗脱液经带有 ECD 检测器的气相色谱仪检测, 外标法定量。[结果] 该方法的线性范围为 0.42~20.0 μg/L, 相关系数 (r)=0.9998, 方法检出限为 0.42 μg/L; 血样中最低检出质量浓度 0.42 μg/L; 样品加标回收率为 82.0%~91.3%。[结论] 该方法灵敏度高, 操作方便, 选择性好, 适用于职业性氯丁二烯中毒的临床诊断和治疗过程。

关键词: 氯丁二烯; 血; 固相萃取; 气相色谱

Determination of Chloroprene in Blood by Solid Phase Extraction Gas Chromatography WANG Chao-
yang, QIN Wen-hua (Henan Institute of Occupational Disease Prevention and Control, Henan 450052, China)

• The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a method for the determination of chloroprene in blood by solid phase extraction gas chromatography. [Methods] Chloroprene in blood samples was concentrated by C18 column and eluted with methanol. The elution was determined by gas chromatography with ECD detector and quantified by external standard method. [Results] The linear range of the proposed method was 0.42~20.0 μg/L, with a correlation coefficient (r) of 0.9998. The detection limit was 0.42 μg/L. The minimum detectable concentration in the blood samples was 0.42 μg/L. The spiked recovery rate was 82.0%~91.3%. [Conclusion] The method is of high sensitivity, easy operation, and high specificity. It can be used for clinical diagnosis and treatment of occupational chloroprene poisoning.

Key Words: chloroprene; blood; solid phase extraction; gas chromatography

氯丁二烯(2-氯-1,3-丁二烯)是氯丁橡胶生产的主要化工原料, 氯丁橡胶是一种耐腐蚀性人造橡胶, 用于汽车零部件、电线电缆外壳、黏合剂和个体防护装备等^[1]。氯丁二烯无色, 易挥发, 主要通过呼吸道吸入和皮肤吸收进入人体, 常发生于单体合成、运输和聚合过程中^[2]。在职业活动中, 特别是在氯丁橡胶的制造过程中, 工人可接触到氯丁二烯蒸汽或液体, 引起急性或慢性中毒。急性中毒以中枢神经系统抑制和呼吸道刺激作用的表现为主。慢性中毒以肝脏损害和神经衰弱综合征为主, 多数病例还有脱发^[3]。

在实际工作中, 对职业性氯丁二烯暴露患者的实际接触量不能得到定量化判定。本研究利用固相萃取的前处理技术, 使目标物得到分离和净化, 然后经过带有 ECD 检测器的气相色谱仪进行检测, 根据 GBZ/T 210.5—2008《职业卫生标准制定指南 第5部分 生物材料中化学物质测定方法》^[4]的性能指标要求进行方法研究, 本文报道该项研究成果。

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0242

[基金项目] 河南省职业病防治研究院国家重点临床专科建设科研项目(编号: [2011]170)

[作者简介] 王超洋(1981—), 男, 硕士生, 主管技师; 研究方向: 环境与职业卫生监测; E-mail: wangchaoyang126@126.com

[作者单位] 河南省职业病防治研究院, 河南 450052

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

Clarus500 气相色谱仪带 ECD 检测器(美国 PerkinElmer 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); AC10 毛细管色谱柱(固定相为 14% 氰丙基苯基 86% 二甲基聚硅氧烷, 30 m×0.32 mm×0.25 μm, 澳大利亚 SGE 公司); LZT 台式离心机(三蝶牌, 上海八二二厂); 一次性人体抗凝血样采集容器(EDTAK₂, 湖南省浏阳市医用工具厂); CNWBOND LC-C18 小柱(200 mg, 3 mL, 上海安谱科学仪器有限公司); Agela Cleanert C18 小柱(200 mg, 3 mL, 天津博纳艾杰尔科技有限公司); 1000 μg/mL 氯丁二烯标准品(1 mL, 溶于甲醇中, 生产批号: 198420, 美国 O2si 公司); 二甲苯(GR, 国药集团化学试剂有限公司); 高纯氮气。

1.2 色谱分析条件

汽化室温度 220℃; 柱箱升温程序: 45℃, 保持 4 min, 以 5℃/min 速率升至 80℃, 保持 5 min; 检测器温度 320℃; 载气为氮气, 流速 1.0 mL/min; 分流进样, 分流比 20:1; 尾吹气 30 mL/min。

1.3 标准应用液的配制

标准应用液(10 μg/mL): 取少量甲醇于 10 mL 容量瓶中, 准确量取 100 μL 氯丁二烯标准品于容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 即为 10 μg/mL 标准应用液。

1.4 固相萃取柱活化

未使用过的 C18 小柱, 依次加入 2 mL 甲醇和 2 mL 去离子

水，自然淋洗通过柱体。

1.5 样品处理

用一次性人体抗凝血样采集容器采集静脉血4mL，样品置于台式离心机中，设置转速4000r/min，离心10min，离心半径10cm，量取上层血浆2mL于活化处理过的C18固相萃取小柱中，血浆流过萃取柱后，加入2mL甲醇洗脱萃取柱，洗脱液置于5mL比色管中，混匀静置，取上清液于气相色谱进样瓶中进行测定。

1.6 工作曲线的配制

准确量取40μL氯丁二烯标准应用液(10μg/mL)于10mL正常人混合血浆中，血浆中氯丁二烯的加标浓度为40μg/L，分别取加标后的血浆0.000、0.050、0.125、0.250、0.400、0.500、0.750、1.000mL于5mL比色管中，然后分别加入未加标的正常人混合血浆2.000、1.950、1.875、1.750、1.600、1.500、1.250、1.000mL，混匀后，配制成血浆中氯丁二烯浓度分别为0.0、1.0、2.5、5.0、8.0、10.0、15.0、20.0μg/L的浓度系列。

1.7 样品测定

在本实验选定的色谱条件下，进样量1.0μL，进行气相色谱分析，根据保留时间定性，峰面积定量，超过工作曲线范围需用甲醇进行稀释。氯丁二烯参考保留时间为3.915 min，色谱图如图1。结果按下式计算： $C=C_0 \times n$

式中： C —血样中氯丁二烯质量浓度(μg/L)； C_0 —稀释后洗脱液中氯丁二烯质量浓度(μg/L)； n —洗脱液在测定时的稀释倍数。

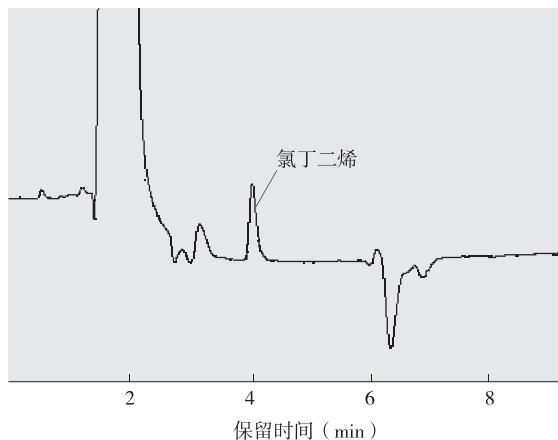


图1 氯丁二烯标准品色谱图

2 结果

2.1 色谱分析条件优化

2.1.1 色谱柱选择 对比了中等极性的Elite-1701毛细管色谱柱与弱极性的AC10毛细管色谱柱对氯丁二烯的响应，结果显示，使用Elite-1701毛细管色谱柱，在0.6~1.2mL/min范围调整载气流速，5~10°C/min范围调整升温速率，甲醇峰与目标峰均重叠，选用AC10色谱柱时可分离甲醇峰与目标峰，对目标物的分离是可行的。

2.1.2 柱箱温度选择 选择标准是既要保证待测物的完全分离，又要保证所有组分能流出色谱柱。起始温度为45°C，保持4min，溶剂与目标物保留时间间隔变大，分离不受影响。升至

80°C保持5min有利于将毛细柱吹扫干净。

2.1.3 载气流速选择 其它条件不变，改变载气流速，结果显示，载气1.0mL/min时，目标物峰形对称，峰宽较窄，目标峰与溶剂峰的保留时间相差2.23min，分离效果较好。

2.1.4 分流比选择 分流比对峰形有较大的影响。改变分流比，观察峰形及峰面积变化。当分流比为20:1时，峰形尖锐、对称，灵敏度高且杂质影响小。

2.2 工作曲线及检出限

在选定的色谱条件下，对配制的工作曲线标准系列按照样品处理步骤处理后进行测定，每个浓度样品测定3次，取平均值。以目标物峰面积(Y)对标准系列质量浓度(X , μg/L)绘制工作曲线，得到线性方程为 $Y=1497.2X-470.37$, $r=0.9998$ 。检测限为3倍噪声所对应的待测物浓度，即0.42μg/L，血浆中氯丁二烯最低检测浓度为0.42μg/L，线性范围为0.42~20.0μg/L。

2.3 加标回收率

用正常人体血浆，加入氯丁二烯标准，制备成浓度分别为7.0, 13.0, 20.0μg/L的低、中、高三个浓度组，每组6个样品，每个样品各测定3次，取平均值，样品加标回收率为81.3%~93.5%，均大于75%，方法准确度和洗脱效率均满足测定方法要求。加标回收率实验结果见表1。

表1 加标回收率($n=6$)

本底值(μg/L)	加标量(μg/L)	平均测得值(μg/L)	平均回收率(%)
0	7.0	5.74	82.0
0	13.0	10.96	84.3
0	20.0	18.26	91.3

2.4 精密度

2.4.1 批内精密度 取正常人体血浆，分别加入高、中、低3组水平氯丁二烯标准样品，按照样品处理步骤处理后进行测定，每组样品连续测定6次，计算各组测定结果的相对标准偏差(RSD)为1.4%~7.4%，均小于10%。

2.4.2 批间精密度 取正常人体血浆18份，分为高、中、低3个浓度组，每组每天制备两个样品，按照样品处理步骤处理后进行测定，连续3d完成。计算各组测定结果的RSD为5.7%~7.8%，均小于10%。精密度实验结果见表2。

表2 精密度实验结果(μg/L, $n=6$)

浓度 (μg/L)	批内精密度			批间精密度		
	均数(\bar{x})	标准偏差(s)	RSD(%)	均数(\bar{x})	标准偏差(s)	RSD(%)
5.0	3.67	0.27	7.4	4.51	0.30	6.7
10.0	7.35	0.10	1.4	8.76	0.68	7.8
20.0	19.87	0.44	2.2	19.93	1.14	5.7

2.5 样品稳定性

取正常人体血浆，加入氯丁二烯标准品，制备成10μg/L的加标样品。将制备好的样品分成3组，每组6个样品。分别在常温、冷藏(4°C)、低温(-18°C)条件下保存，于第1天、第3天、第7天各测定1组，按下式计算不同保存条件下氯丁二烯浓度的下降率： $R=[(m_1-m_2)/m_1] \times 100\%$

式中： R —下降率(%)； m_1 —第1天测定均值(μg)； m_2 —

保存当天的测定均值(μg)。

在常温和4℃保存,第3天血浆中氯丁二烯浓度下降率即大于10%,且下降幅度较大,说明该条件下不适合样品保存。在-18℃低温条件下,样品可保存近7d,最好3d内测定。结果见表3。

表3 稳定性实验结果(10 μg/L)

保存条件	氯丁二烯浓度下降率(%)	
	第3天	第7天
常温	83.0	96.7
冷藏(4℃)	68.0	95.2
低温(-18℃)	6.7	10.7

2.6 固相萃取柱的对比实验

取两个不同品牌C18小柱,分别是Agela Cleanert C18柱和CNWBOND LC-C18柱,制备一定浓度的加标样品,用这两种C18小柱进行处理,测定结果相差0.15%,说明两种品牌的C18萃取柱性能差别甚微。

2.7 扰扰实验

根据某合成橡胶厂的职业病危害因素分析^[5],氯丁二烯主要存在于单体合成和橡胶聚合加工工序,与其共存的职业病危害因素还有二甲苯。因此,本实验选择二甲苯作为干扰物。

取加标浓度为10 μg/L的4组血样品,1组不加干扰物二甲苯,另外3组分别加入不同浓度的二甲苯。二甲苯参考保留时间为4.656 min,与目标物氯丁二烯能够完全分离。不加入干扰物的组分别与另外3组测定结果对比,结果偏差为0.4%~1.5%,均小于10%,二甲苯对该测定方法无干扰。

2.8 方法应用

在对某企业职工体检中,随机抽取10份血样,按照本研究

方法进行测定,结果氯丁二烯浓度均小于0.42 μg/L。

3 讨论

ECD作为一种选择性检测器对含有卤化物和磷(硫)化物等电负性物质具有很强的选择性和很高的灵敏度,降低了方法的检测限。同时,方法样品处理过程不经吹扫富集,减少了处理步骤,降低处理过程中目标物的损失。

该方法具有灵敏度高、操作方便、样品处理简单等优点,且各项性能指标均满足GBZ/T 210.5—2008《职业卫生标准制定指南 第5部分:生物材料中化学物质测定方法》^[5]的要求。本项检测有望为氯丁二烯中毒的临床诊断和治疗提供切实帮助。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] LYNCH M. Manufacture and use of chloroprene monomer [J]. Chem Biol Interact, 2001, 135-136: 155-167.
- [2] LYNCH J. Occupational exposure to butadiene, isoprene, and chloroprene [J]. Chem Biol Interact, 2001, 135-136: 207-214.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GBZ 32—2002 职业性氯丁二烯中毒诊断标准 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [4] 中华人民共和国卫生部. GBZ/T 210.5—2008 职业卫生标准制定指南 第5部分: 生物材料中化学物质测定方法 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [5] 韩小红, 杨雷波, 董瑞凤. 某合成橡胶厂化学有害因素浓度测定分析 [J]. 职业与健康, 2012, 28 (4): 413-415.

(收稿日期: 2014-02-19)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 张晶; 校对: 洪琪)

【精彩预告】

上海市居民大肠癌早期发现知识和行为调查

龚杨明, 鲍萍萍, 王春芳, 等

为了解上海市15岁及以上居民在大肠癌相关早期发现知识和行为现状,为开展大肠癌筛查和早期发现工作提供科学依据。科研人员利用2010年上海市慢性病及其危险因素监测调查数据,采用多阶段分层概率随机抽样方法,对15 732名常住居民进行问卷调查。结果显示,获取有效问卷15 663份,15岁及以上居民对大肠癌的早期异常体征和相关检查,包括每年主动1次肛指检查、每年主动1次大便隐血检查(FOBT)和50岁及以上每5年主动1次肠镜检查,这4项的总体知晓率分别为44.04%、22.62%、20.97%和16.83%。不同性别、区域、年龄和文化程度者对此的知晓率差异均有统计学意义($P < 0.05$)。50~74岁年龄居民曾做过肛指检查、FOBT和肠镜检查者的比例分别为12.07%、6.65%和4.82%。不同年龄和文化程度居民受检比例差异有统计学意义($P < 0.01$),中心城区和非中心城区居民受检比例差异无统计学意义;除肛指检查外,男、女性受检比例差异亦无统计学意义。在曾经做过相关检查的调查对象中,不同性别、年龄、地区和文化程度者最近一次接受肛指和肠镜检查的时间距调查时间间隔差异无统计学意义。由此认为:上海市居民对大肠癌早期发现的认知较差,参加相关早期发现检查的比例较低。应加强居民大肠癌早期发现知识的健康教育和行为指导,提高居民有关大肠癌早期发现的知识知晓率,增强就医意识,改变就医行为,减少自身延误,并提高居民主动性防癌体检比例及大肠癌项目性筛查参与率。

此文将于近期刊出,敬请关注!