

[26] Aldridge J E, Levin E D, Seidler F J et al. Developmental exposure of rats to chlorpyrifos leads to behavioral alterations in adulthood involving serotonergic mechanisms and resembling animal models of depression [J]. *Environ Health Perspect* 2005 113 (5): 527-531

[27] Raines K W, Seidler F J, Slobkin T A. Alterations in serotonin transporter expression in brain regions of rats exposed neonatally to chlorpyrifos [J]. *Dev Brain Res* 2001 130 (1): 67-72

[28] Aldridge J E, Meyer A, Seidler F J et al. Alterations in central nervous system serotonergic and dopaminergic synaptic activity in adulthood after prenatal or neonatal chlorpyrifos exposure [J]. *Environ Health Perspect* 2005 113 (8): 1027-1031.

[29] Karen D J, Li W, Ha P P R et al. Striatal dopaminergic pathways as a target for the insecticides permethrin and chlorpyrifos [J]. *Neurotoxicology* 2001 22 (6): 811-817

[30] Whitney K D, Seidler F J, Slobkin T A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: cellular mechanisms [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995 134 (1): 53-62

[31] Qiao D, Seidler F J, Slobkin T A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos modeled in vitro: comparative effects of metabolites and other cholinesterase inhibitors on DNA synthesis in PC12 and C6 cells [J]. *Environ Health Perspect* 2001 109 (9): 909-913

[32] Raheja G, Gill K D. Altered cholinergic metabolism and muscarinic receptor linked second messenger pathways after chronic exposure to dichlorvos in rat brain [J]. *Toxicol Ind Health* 2007 23 (1): 25-37.

[33] Meyer A, Seidler F J, Aldridge J E et al. Critical periods for chlorpyrifos induced developmental neurotoxicity: alterations in adenylyl cyclase signaling in adult rat brain regions after gestational or neonatal exposure [J]. *Environ Health Perspect* 2004 112 (2): 295-301

[34] Schuh R A, Lein P J, Beckles R A et al. Noncholinesterase mechanisms of chlorpyrifos neurotoxicity: altered phosphorylation of Ca^{2+} /cAMP response element binding protein in cultured neurons [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002 182 (2): 176-185

[35] Caughlan A, Newhouse K, Namkung U et al. Chlorpyrifos induces apoptosis in rat cortical neurons that is regulated by a balance between p38 and ERK/JNK MAP kinases [J]. *Toxic Sci* 2004 78 125-134

甲苯暴露标志物邻甲酚测定方法的比较与评价

陈红霞, 梅勇*

(武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430065)

摘要: 尿中邻甲酚 (o-cresol) 与甲苯暴露存在良好相关关系, 是中低浓度甲苯接触的特异和敏感生物标志物。本文综述了尿中 o-cresol 作为职业接触甲苯的生物监测指标研究现状, 介绍了国内外检测尿中 o-cresol 的各种方法。目前国内外研究检测职业接触甲苯的暴露标志物尿中 o-cresol 多用气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和气相色谱-质谱 (GC/MS) 等方法。

关键词: 甲苯; 尿中邻甲酚; 生物监测

中图分类号: R446.12 C625.11 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)03-0202-03

Comparison of methods for determination of urinary o-cresol as biomarker of toluene exposure

CHEN Hong-xia, MEI Yong*

(Department of Occupational Health Medical College, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

Abstract: As urinary o-cresol concentrations are well related with toluene exposure levels, it is considered a sensitive and specific biomarker of low and moderate toluene exposure. Urinary o-cresol concentration might be determined by various methods as gas chromatography with hydrogen flame ionization detector (GC/FID), gas chromatography combined with mass spectrometry (GC/MS) or high performance liquid chromatography (HPLC). The application and validity of related methods for determination of urinary o-cresol reported and their application and validity as the biomarker of occupational toluene exposure were all reviewed in this paper.

Key words: toluene; urinary o-cresol; concentration; biological monitoring

尿中甲酚是由约 1% 吸收的甲苯代谢的环氧化甲苯中间物, 可进一步转化为邻甲酚、间甲酚和对甲酚 3 种同分异构体^[1]。邻甲酚 (o-cresol) 是甲苯的微量代谢物, 虽然尿中排

出量仅为吸入甲苯的 0.31%, 但与马尿酸、间甲酚及对甲酚相比, 邻甲酚的背景干扰最低^[2]。o-cresol 经尿液排出的半减期为 3 h^[3], 是甲苯接触敏感的生物标志物。在职业与环境低水平甲苯暴露时, 马尿酸与吸入甲苯浓度之间已不存在相关性, 而尿中邻甲酚与空气中甲苯具有相关关系, 且具有较低背景干扰值, 受吸烟、饮酒干扰小, 其生物监测的应用价值明显优于马尿酸。近年, 德国、美国相继制定了 o-cresol 的生物限值, 而不再推荐马尿酸。

收稿日期: 2010-01-05

作者简介: 陈红霞 (1976-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物监测。

*. 通讯作者, 副教授, 硕士生导师。

1 α -cresol在生物监测中的应用

1.1 α -cresol作为生物标志物研究概况

Ducos等^[4]研究了 29名印刷工人 24 h甲苯消除动力学情况,同时选取 6名志愿者做对照试验。采用个体采样器监测空气甲苯接触浓度,采集样品用顶空 GC分析尿样中甲苯及邻甲酚。通过多重回归分析,得出志愿者尿中邻甲酚在空气甲苯 TWA为 50 ppm时的相当量为 0.56 mg/g肌酐,相关系数 ($r=0.936$ $P=2.0 \times 10^{-3}$)。而接触组中,线性回归方程为 $\log Y=0.864 \log X-3.656$ ($n=93$) ($r=0.873$ $P<10^{-4}$)。当 TWA为 50 ppm时,所有工人 ($n=93$) 班末尿中邻甲酚的相当排泄量为 0.76 mg/g肌酐,非吸烟者尿中邻甲酚的相当排泄量为 0.68 mg/g肌酐 ($n=66$) 吸烟组尿中邻甲酚的相当排泄量为 0.98 mg/g肌酐 ($n=27$)。研究还表明吸烟者尿中邻甲酚不论在经肌酐校正还是未经校正均有显著升高,部分原因在于烟草中含有一定量的甲苯,也可以解释为邻甲酚在未接触人群中具有一定的本底值。尽管邻甲酚与空气中甲苯具有较好的相关性,经肌酐校正的邻甲酚比尿中甲苯仍有较大的变异性,而且对有吸烟习惯的人更为敏感。如果经肌酐很好的校正,邻甲酚与空气甲苯接触浓度会有更好的相关性。在尿中甲苯检测方法还未达到成熟,采样方法还未统一规范的情况下,尿中邻甲酚仍不失为值得考虑的甲苯接触标志物。

Uka等^[5]选取了甲苯接触浓度不同的 6个工厂,采用个体采样器采集了 122名甲苯接触者呼吸带 TWA水平,其几何均数 (GM) 为 10.4 ppm,浓度范围为 0.2~120.8 ppm,空气甲苯 TWA浓度与尿 α -cresol的线性回归方程为 $Y=211+15.4X$ ($r=0.81$ $P<0.01$)。在甲苯接触高浓度水平 TWA GM=40.2 ppm时,两者的相关系数高达 0.84 而在接触水平较低的工厂 (TWA GM=2 ppm) 工人的尿 α -cresol与空气 TWA的相关系数仅为 0.17 研究还报告了邻甲酚在非接触人群的含量分别为算术均数 (AM) 149 μ g/L GM=107 μ g/L Max=378 μ g/L 估算了非接触人群的尿中邻甲酚 95%上限为 682 μ g/L 而非接触人群尿中的马尿酸 95%上限为 1.285×10^6 μ g/L

Inoue等^[6]应用个体采样器检测了 108名甲苯作业工人个体甲苯接触水平,其浓度范围为 0.2~8.8 ppm,平均值为 (1.89 ± 2.67) ppm,同时测定当日作业工人班末尿 α -cresol浓度范围在 91~1102 μ g/g肌酐,平均值为 (105 ± 3.28) μ g/g肌酐。另测定非接触对照组 17人,尿中 α -cresol浓度范围在 5~386 μ g/g肌酐,平均值为 (63.2 ± 3.0) μ g/g肌酐。对尿中 α -cresol含量与空气甲苯 TWA作统计检验,显示二者有较弱的相关性 ($r=0.202$ $P<0.05$)。Inoue等^[6]的研究未发现性别、年龄等因素对 α -cresol测定值的影响,而且类似浓度的苯和二甲苯与甲苯共同暴露对 α -cresol测定结果几乎没有影响。一般认为,非吸烟、非职业接触甲苯人群尿 α -cresol的浓度低于 0.69 mg/g肌酐,但在重度吸烟人群中尿 α -cresol的浓度会超过 0.98 mg/g肌酐。所以,吸烟对低浓度接触甲苯时尿 α -cresol有一定贡献,但在职业接触限值浓度下 (50 ppm, 188 mg/m³) 所贡献的 α -cresol则是微不足道的。

1.2 α -cresol作为生物接触限值的应用

目前部分发达国家将尿中邻甲酚作为职业甲苯接触的生物学监测指标之一,提出了与本国工作场所空气甲苯接触限值相应的尿邻甲酚生物限值。美国 ACGIH推荐的尿中邻甲酚 BEI为 0.5 mg/g肌酐^[7] (TWA=50 ppm);德国 2006年国内推荐了相对含量较高、检测方法较为简便的血中甲苯原形作为生物学监测指标,其生物接触限值为班末血中甲苯 1.0 mg/L^[8],其特异性较高,无本底值。尿中邻甲酚的 BATI值为 3.0 mg/L^[8]。2007年美国在充分总结甲苯的职业流行病学资料以及毒理学数据的基础上,考虑到甲苯对中枢神经系统的毒性作用,将职业接触限值从早期的 50 ppm (PC-TWA) 修订为 20 ppm (PC-TWA)。我国工作场所中甲苯的职业接触限值为 50 mg/m³ (PC-TWA) 和 100 mg/m³ (PC-STEL),推荐了尿中马尿酸的职业接触生物限值为工作班末 1.5 g/g肌酐^[9],班末呼出气中甲苯为工作班末 20 mg/m³,尿中邻甲酚的接触限值尚在研究之中。

2 α -cresol的分析方法

2.1 高效液相色谱法

Ikeda^[10]应用 HPLC对加酸水解后的尿样进行了分析,采用 XDB-C₁₈ (4.6 mm×150 mm×5 μ m) 色谱柱分离,流动相为 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液 (H₃O) 与甲醇。经时间梯度洗脱,甲醇在流动相所占比例在 8 min为 5%,23 min增至 65%,流速为 0.8 ml/min,色谱分离柱温设定为 30℃。采用二极管阵列检测器进行检测,检测波长为 205 nm,方法的平均加标回收率为 100.6%,精密度 (RSD) 为 3.42%。米亚娴等^[11]建立了柱前衍生高效液相色谱法测定人体尿中邻甲酚的方法。尿样经浓盐酸酸化后,95℃水浴保温 1.5 h 经衍生剂衍生后混匀,30 min后离心过滤,取 1 μ l 上清液进样,经 C₁₈ 反相柱分离,紫外检测器检测,以保留时间定性,峰高定量。流动相为甲醇和水 (85:15 V/V),流速为 1.0 ml/min,色谱柱采用 Brmasil C₁₈,规格为 4.6 mm×250 mm×5 μ m,检测波长为 328 nm,柱温:35℃,4 μ l 进样时方法的检出限为 0.05 μ g/L,其与空气甲苯 TWA的相关系数为 0.63 不足之处是要经过复杂的柱前衍生处理,操作步骤复杂,在样品转移过程中会有一定损失,影响结果的重现性。

2.2 气相色谱法

Janasik等^[12]将 200 μ l 盐酸加入到 1 ml尿样中,100℃水解 10 min,把 200 μ l 内标物 (12 mmol/L 3,4-二甲基苯酚) 加入到水解产物中,再用 5 ml三氯甲烷将尿中的邻甲酚萃取出来,将有机层挥发定容至 1 ml后进样分析。仪器条件为 HP5890系列,色谱柱采用 HP-1 (30 m×0.32 mm×1.05 μ m)。方法的线性范围为 0.3~3.0 mg/L, RSD为 7.7%,检出限为 0.58 mg/L,尿中邻甲酚与空气甲苯 TWA的相关系数为 0.87。Nise^[13]介绍了以二甲亚砜为内标物检测尿中邻甲酚的 GC/FID方法。尿样在 1.8 mol/L硫酸 (10:1) 中 100℃水解 1 h 再用二氯甲烷萃取,萃取液以 5% NaHCO₃中和后进样分析,采用石英毛细管柱 DB-1701 (30 m×0.25 mm),方法检出限为 0.1 μ mol/L。Ducos等^[4]报道了一种改良测定尿中邻

甲酚的方法。尿样经浓缩的盐酸水解后用二氯甲烷萃取, 3-4-二甲基亚砜作内标, 用配备自动进样装置 A200S热解析仪进样分析, 采用不分流方式进样, 不分流时间为 0.25 min, 载气流速为 25 mL/min, 进样口温度为 200°C, 程序升温模式, 柱温箱初始温度为 134°C, 保持 16 min, 然后以 35°C/min 升到 250°C, 保持 5 min, FID 检测器检测定量。色谱分析柱采用 &W 公司 DB-1701 (60 m × 0.53 mm × 1 μm), He 作载气, 柱流速为 7.5 mL/min, 结果发现在空气甲苯暴露浓度为 50 ppm 时, 尿中邻甲酚为 0.56 mg/肌酐, 二者的相关系数为 0.936。Ilona 等^[10]用 GC 法测定尿中邻甲酚, 色谱柱为 &W 公司 DB-5 (30 m × 250 μm × 0.25 μm), 载气为 N₂, 流速为 1 mL/min, 程序升温模式, 初始柱温为 50°C, 保持 1 min, 以 20°C/min 升到 300°C 保持 2 min, 采用不分流方式进样, 隔垫吹扫时间为 1 min, 进样口温度为 300°C, 进样量为 1 μL, 检测器温度设定为 300°C。方法的平均加标回收率为 100.8%, RSD 为 3.63%, 采用程序升温和不分流进样模式具有更高的检测灵敏度和精密度。

2.3 固相微萃取-顶空气相色谱-质谱法 (SPME-HS-GC/MS)

Fustjón 等^[14]基于甲酚的挥发性, 通过水解甲酚的化合物, 顶空进样进行热解吸 GC 分析。解吸温度为 250°C, He 气作载气, 流速采用恒流模式为 1 mL/min。作者探讨使用两种不同的色谱柱进行分离, 分别运用程序升温模式。采用 Supelcowax 10 柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), 初始柱温设为 140°C, 保持 8 min, 再以 25°C/min 升温至 225°C, 保持 2.5 min, 再以 25°C/min 升温至 250°C, 保持 1 min, 总运行时间为 15 min。对于 CP Cresol 柱 (50 m × 0.25 mm × 0.20 μm), 初始柱温设为 50°C, 保持 8 min, 以 25°C/min 速度升至 120°C, 保持 40 min, 总运行时间为 51 min。相比较而言, CP Cresol 柱需要较长的保留时间, 但对 o-cresol, p-cresol, m-cresol 是特异性的, Supelcowax 10 柱是极性柱, p-cresol, m-cresol 不能彻底分开。该研究还探讨了反应条件的优化, 提出加入 NaCl 的盐析作用, 就可提高甲酚的响应信号, 提高了检测方法的灵敏度。同时提出了最佳采样和解吸时间及水解的最适 pH 值。方法的线性范围为 0~5 mg/L, 邻甲酚检出限为 0.006 mg/L, 间甲酚为 0.007 mg/L。固相微萃取的方法避免大量使用有机溶剂, 顶空进样大大减少了手工操作, 整个分析只在一个容器中进行, 没有样品转移, 避免了样品损失, 提高了分析效率和精密度, 节约了时间, 降低了成本, 为目前国外较多采用的检测尿中邻甲酚的方法。

3 结语

开展职业接触甲苯尿中 o-cresol 的生物监测, 首要的是建立行之有效的检测方法, 其次是在现场劳动卫生和流行病学调查基础上, 建立职业人群空气甲苯接触水平与尿中代谢物水平的数学模型或线性回归方程, 以此研究和制定 o-cresol 的生物接触限值。目前国外研究机构主要采用 SPME-HS-GC/MS 检测尿 o-cresol, 但由于所需检测仪器条件要求较高, 设备昂贵, 难于大范围开展实际应用。GC 则是各国职业卫生机构对甲苯进行生物监测的常用方法, 可定量区分职业与非职业甲

苯接触。而 HPLC 法具有较高的精密性及灵敏度, 同时流动相的选择余地大, 室温条件下即可完成分析, 对仪器条件要求低, 比 GC 方法更具有应用价值。目前国内 HPLC 仪器设备也逐步普及, 可考虑将其作为职业甲苯接触尿中 o-cresol 的首选检测方法。

参考文献:

- [1] Šperlingová J, Dabrowska L, Stránský V, et al. Human urine certified reference material CZ 6010: creatinine and toluene metabolites (hippuric acid and o-cresol) and a benzene metabolite (Phenol) [J]. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387: 2419-2424.
- [2] Pierce CH, Chen YL, Dills PL, et al. Toluene metabolites as biological indicators of exposure [J]. *Toxicology Letters* 2002; 129: 65-76.
- [3] Baelum J, Dossing M, Hansen SH, et al. Toluene metabolism during exposure to varying concentrations combined with exercise [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 1987; 59: 281-294.
- [4] Ducos P, Berge M, Franc JM, et al. Biological monitoring of exposure to solvents using the chemical itself in urine: application to toluene [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 2008; 81: 273-284.
- [5] Uka H, Kawai T, Inoue Q, et al. Comparative evaluation of biomarkers of occupational exposure to toluene [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 2007; 81: 81-93.
- [6] Inoue Q, Kawai T, Uka H, et al. Limited validity of o-cresol and benzymercapturic acid in urine as biomarkers of occupational exposure to toluene at low levels [J]. *Industrial Health* 2008; 46: 318-325.
- [7] American Conference of Governmental Industrial Hygienists TLVs and BEIs: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices [M]. Cincinnati: 2006: 91-106.
- [8] DFG. List of MAK and BAT Values [M]. Weinheim: Wiley-VCH Verlag; 2008: 195-217.
- [9] 沈惠麒, 顾祖维, 吴宜群. 生物监测和生物标志物——理论基础及应用 [M]. 2版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 152-153.
- [10] Ilona Š, Ludmila D, Vladimír Š, et al. Preliminary study to prepare a reference material of toluene metabolite o-cresol and benzene metabolite Phenol in human urine [J]. *Accred Qual Assur* 2006; 11: 231-235.
- [11] 米亚娟, 刘黛莉, 李志华, 等. 尿邻甲酚作为接触甲苯生物监测指标的探讨 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2002; 20: 200-202.
- [12] Beata J, Marek J, Piotr J. Excretion of unchanged volatile organic compounds (toluene, ethylbenzene, xylene and mesitylence) in urine as result of experimental human volunteer exposure [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 2008; 81: 443-449.
- [13] Gun N. Urinary excretion of o-cresol and hippuric acid after toluene exposure in rotogravure printing [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 1992; 63: 377-381.
- [14] Fustjón S, Mercadante R, Campo L, et al. Determination of urinary ortho and meta-cresol in humans by headspace SPME gas chromatography/mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B* 2005; 817: 309-317.