

• 论 著 •

接触环氧乙烷医务人员尿液中 N-乙酰基-S-(2-羟乙基)-L-半胱氨酸水平测定方法研究^{*}

熊晓芸¹, 姜秋霞¹, 杨飞朋²

1. 江苏省疾病预防控制中心职业病防治所检验科, 江苏南京 210028; 2. 江苏省中医院大外科, 江苏南京 210004

摘要:目的 探讨接触环氧乙烷(EO)医务人员尿液中 N-乙酰基-S-(2-羟乙基)-L-半胱氨酸(HEMA)的测定方法, 尝试评估该群体 EO 内暴露水平。方法 选取江苏省中医院日常工作中接触、使用 EO 消毒医疗用品的 12 名手术室器械护士作为试验组, 另选取同期未接触 EO 消毒医疗用品的 12 名放射科医护志愿者作为对照组, 收集两组研究对象工作日 24 h 尿液, 尿样在酸化、离心、过滤、稀释后, 经超高效液相色谱仪(UPLC)C18 色谱柱分离, 以乙酸水溶液、乙腈为流动相进行梯度淋洗, 再经三重四极杆串联质谱多反应监测模式定性、定量, 比较两组 HEMA 水平。结果 HEMA 的线性范围为 0.1~100.0 $\mu\text{g/mL}$, 相关系数为 0.999 1, 检出限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$; 当加标水平为 5.0、20.0、80.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 测得加标回收率为 91.6%~94.7%, 批内精密度为 4.7%~7.2%, 连续测定 3 d 的批间精密度为 4.5%~8.1%; 试验组和对照组 HEMA 水平比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 本研究所使用的主要性能指标均满足《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》的要求, 适用于接触 EO 医务人员尿液中 HEMA 水平的测定, 所需仪器设备均较常见, 便于推广。

关键词: N-乙酰基-S-(2-羟乙基)-L-半胱氨酸; 尿液; 环氧乙烷

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.22.015 **中图法分类号:** R135.1

文章编号: 1673-4130(2021)22-2758-04

文献标志码: A

Determination of N-acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-L-cysteine in urine of medical staff exposed to ethylene oxide^{*}

XIONG Xiaoyun¹, JIANG Qiuxia¹, YANG Feipeng²

1. Department of Clinical Laboratory, Institute of Occupational Disease Prevention and Control, Jiangsu Center for Disease Control and Prevention, Nanjing, Jiangsu 210028, China; 2. Department of Surgery, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210004, China

Abstract: **Objective** To investigate the determination method of N-acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-L-cysteine (HEMA) in urine of medical workers exposed to ethylene oxide (EO), and try to evaluate the exposure level in this population. **Methods** A total of 12 operating room instrument nurses of Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine who were exposed to EO disinfection medical products in daily work were selected as the experimental group, and 12 radiology volunteers who were not exposed to EO disinfection medical products in the same period were selected as the control group, urine samples of 24 h in workday were collected in each group. After acidification, centrifugation, filtration and dilution, the urine sample was separated by ultra high performance liquid chromatography (UPLC) C18 column, gradient eluted with acetic acid aqueous solution and acetonitrile as mobile phase, and then qualitative and quantitative detection under the multi-reaction monitoring mode of triple quadrupole tandem mass spectrometry was conducted. HEMA levels were compared between the two groups. **Results** The linear range of HEMA was 0.1–100.0 $\mu\text{g/mL}$, correlation coefficient was 0.999 1, detection limit was 0.03 $\mu\text{g/mL}$, limit of quantitation was 0.1 $\mu\text{g/mL}$. When the spiked concentration was 5.0, 20.0, 80.0 $\mu\text{g/mL}$, the recovery was 91.6%–94.7%, the intra batch precision was 4.7%–7.2%, and the inter batch precision was 4.5%–8.1%. There was no significant difference in HEMA

^{*} 基金项目: 国家卫生健康委员会卫生健康标准制修订项目(20202002)。

作者简介: 熊晓芸, 女, 副主任技师, 主要从事职业病领域临床检验研究工作。

本文引用格式: 熊晓芸, 姜秋霞, 杨飞朋. 接触环氧乙烷医务人员尿液中 N-乙酰基-S-(2-羟乙基)-L-半胱氨酸水平测定方法研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(22): 2758-2761.

levels between experimental group and control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The main performance indexes of the method meet the requirements of Guidelines for the formulation of Occupational Health Standards Part 5: methods for the determination of chemical substances in biomaterials. It is suitable for the determination of HEMA in urine of medical personnel exposed to EO. The required instruments and equipment are common and easy to popularize.

Key words: N-Acetyl-S-(2-hydroxyethyl)-L-cysteine; urine; ethylene oxide

环氧乙烷(EO),又名氧化乙烯,是一种最简单的环醚,在常温下为无色带有刺激性气味的气体,蒸汽压高,30℃时可达 141 kPa。高蒸汽压特性使得 EO 作为消毒剂熏蒸消毒时穿透力较强,且不损害灭菌物品,被医疗机构广泛应用于医疗用品诸如绷带、缝线及手术器具等的消毒中。但 EO 具有致突变性、胎儿毒性和致畸特性,对睾丸功能具有不良影响,并能对体内多个器官系统产生损伤。人体长期少量接触 EO 可引起神经衰弱综合征和植物神经功能紊乱。世界卫生组织国际癌症研究机构已将 EO 列为 1 类致癌物。消毒后的医疗用品会有一定水平的 EO 残留,《医疗器械生物学评价第 7 部分:环氧乙烷灭菌残留量》^[1]中规定,短期、长期和持久接触器械 EO 残留量的平均日剂量不应超过 4 mg/d、2 mg/d 和 0.1 mg/d。我国医护群体近 880 万人,该群体在日常工作中长期、频繁接触 EO 消毒后的医疗用品,导致的职业暴露、职业损伤时有发生报道^[2-7]。国内外都制定了 EO 职业接触限值,《工作场所空气有毒物质测定方法:环氧化合物》^[8]中规定了工作场所空气中 EO 的采集和测定方法,通过个体采样的方式可有效评估医务人员经呼吸道吸入的 EO 暴露量,未考虑皮肤、黏膜等接触产生的暴露,本研究通过测定 EO 在尿液中的生物标志物 N-乙酰基-S-(2-羟乙基)-L-半胱氨酸(HEMA)水平以评估该群体实际内暴露水平。已有多项研究报道了尿液中 HEMA 测定的方法^[9-11]。本研究参考已报道的方法,根据国内同类实验室现况,优化了尿液中 HEMA 的测定方法,初步应用于评估接触 EO 医务人员的职业暴露情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 8 月江苏省中医院日常工作中接触、使用 EO 消毒医疗用品的 12 名手术室器械护士作为试验组,均为女性,年龄 21~33 岁;另选取同期未接触 EO 消毒医疗用品的 12 名放射科医护志愿者作为对照组,均为女性,年龄 23~35 岁,两组年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 仪器与试剂 超高效液相色谱仪(UPLC)(30A,日本岛津公司),配备三重四极杆质谱(QTRAP 5500,美国 AB 公司);Acquity UPLC BEH C18 液相色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm,美国 Waters 公司);Millipore 纯水机;SIGMA 台式离心机。HEMA

标准品(纯度大于 98%,美国 TRC 公司);甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(A.R,南京化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司)、乙酸(色谱纯,上海 Aladdin 公司);流动相用水为去离子水。

1.3 方法

1.3.1 溶液配制 (1)标准储备液(1 000 μg/mL):称取 10 mg HEMA 标准品于 10 mL 容量瓶中,用 10%甲醇溶液溶解,定容后 -20℃ 冷冻避光保存。(2)标准中间液(100 μg/mL):取 1 mL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中,用 10%甲醇溶液稀释,定容后 4℃ 冷藏避光保存。(3)0.2%乙酸水溶液:2 mL 乙酸用去离子水定容至 1 L,用作流动相水相。

1.3.2 标本制备 收集两组研究对象工作日 24 h 尿液(甲苯防腐),分别混匀后取出部分尿样分装到 5 支 10 mL 标本管中,与剩余尿样一并冷冻保存;测定前取其中 1 支分装至标本管,室温下解冻,混合均匀后取 1.0 mL 的尿液,加 20 μL 的甲酸酸化,12 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜;移取 200 μL 滤液至棕色进样瓶中,加 800 μL 0.2%甲酸水溶液,混匀后待测。

1.3.3 仪器条件 (1)色谱条件:流动相为 0.2%乙酸水溶液和乙腈,采用梯度洗脱程序,乙腈的体积分数在 0.0~<1.0 min 内为 5%,1.0~<4.0 min 内线性增加至 95%,4.0~<5.0 min 内维持在 95%,5.0~5.5 min 内线性减少至 5%,平衡至 6.0 min 结束;流量为 0.5 mL/min;柱温箱设定为 40℃;进样 2.0 μL,保留时间为 1.74 min。(2)质谱条件:采用电喷雾离子源,负离子扫描,多反应监测(MRM)模式;将 10 μg/mL HEMA 标准溶液注入三重四极杆串联质谱仪的一级质谱中并进行扫描,选择确定化合物分子离子峰丰度最大的质谱条件;再在二级质谱中进行子离子扫描,调整优化碰撞能量,在保证子离子分辨率的前提下获得最佳灵敏度;HEMA 分子结构中存在羧基,电离方式采取电喷雾离子源质谱;根据色谱条件优化后的保留时间(1.74 min)截取 1.0~2.5 min 流动相进质谱仪;喷雾电压 -4.5 kV;离子源温度 540℃;雾化气流量 8.4 L/min,气帘气流量 30.5 L/min,辅助雾化气流量 6.8 L/min,锥孔电压为 -40 V;母离子 m/z 为 206,子离子 m/z 分别为 75 和 77(定量离子),碰撞能量分别为 -34 eV 和 -18 eV。

1.3.4 定量方式 分别使用去离子水和空白尿液(经上述标本制备程序处理, HEMA 水平小于方法检测限)绘制标准曲线和工作曲线, HEMA 在 0.1~100.0 $\mu\text{g/mL}$ 内, 工作曲线的斜率为标准曲线斜率的 70%, 存在较强的基质效应, 确定采用工作曲线法来定量。

1.3.5 方法学参数测定 按照《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》^[12] 中“测定方法性能指标的试验”相关要求方法进行方法学参数的确定。线性范围、检出限: 用上述空白尿液绘制工作曲线, 以定量离子峰面积与 HEMA 水平作工作曲线。回收率与精密度: 用空白尿液加标, 添加水平至 5.0、20.0、80.0 $\mu\text{g/mL}$ (方法测定范围内低、中、高水平), 各做 6 个平行, 经前处理后上机测定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 质量色谱图 在上述色谱、质谱条件下, HEMA 峰型良好, 保留时间为 1.74 min, 见图 1。

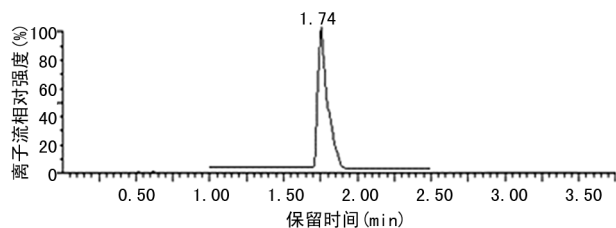


图 1 HEMA 加标样品质量色谱图

2.2 方法学参数测定结果 HEMA 的线性范围为在 0.1~100.0 $\mu\text{g/mL}$, 相关系数为 0.999 1; 3 倍信噪比计算的方法检出限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 10 倍信噪比计算的方法定量限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。当加标水平为 5.0、20.0、80.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 加标回收率为 91.6%~94.7%, 批内精密密度为 4.7%~7.2%, 连续测定 3 d 的批间精密密度为 4.5%~8.1%。

2.3 试验组与对照组尿液中 HEMA 水平比较 对照组尿液中 HEMA 的水平为 $(1.44 \pm 0.29) \mu\text{g/g}$ 肌酐, 试验组尿液中 HEMA 水平为 $(2.30 \pm 1.45) \mu\text{g/g}$ 肌酐, 两组 HEMA 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 对照组、试验组尿液中 HEMA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HEMA ($\mu\text{g/g}$ 肌酐)	t	P
对照组	12	1.44 ± 0.29	0.705	0.069
试验组	12	2.30 ± 1.45		

3 讨论

《工作场所有害因素职业接触限值第 1 部分: 化学有害因素》^[13] 中 EO 的时间加权平均容许水平 (PC-

TWA) 为 2 mg/m^3 , 且提示 EO 除通过吸入接触外, 还可通过皮肤、黏膜和眼睛直接接触, 经完整的皮肤吸收而引起全身效应, 即使空气中 EO 的水平 $\leq$ PC-TWA, 劳动者仍有可能通过皮肤接触而引起过量接触。医护人员在日常工作中, 皮肤、黏膜会长期、频繁接触消毒后医疗用品残留的 EO 及其蒸气, 现有的测定方法仅关注吸入接触, 无法完整评估医护群体的实际暴露水平。现有研究普遍认为, HEMA 是 EO 在尿液中的主要代谢产物, 丙烯腈、1,2-二溴乙烷和氯乙烯也可以通过代谢产生 HEMA, 但医护人员一般不会接触^[9-11]。本研究将 HEMA 作为医护人员 EO 职业暴露的生物标志物, 通过测定其在尿液中的水平来评估该群体真实内暴露水平。

健康人 24 h 尿量为 0.8~2.0 L, 收集研究对象工作日 24 h 尿液 (甲苯防腐), 测定其中的 HEMA 水平, 可准确评估其 EO 内暴露水平; 混匀后采取小体积分装方式冷冻保存便于单指标重复测定及多指标测定的开展, 避免大体积标本的反复冻融造成待测物损失及标本基质情况的改变。目前主流 UPLC 配备的色谱柱填料粒径普遍不超过 2 μm (本研究所用色谱柱填料粒径为 1.7 μm), 分离能力得到极大提升, 搭配三重四极杆串联质谱, 可有效控制质谱检测的离子抑制现象并降低待测物的检出限, 为在样品前处理方式中采取酸化、离心、过滤、稀释后直接上机测定的方法提供了技术支撑, 为国内未购置自动固相萃取仪的实验室开展相关检测提供简便、有效的解决方案。以去离子水搭配有机溶剂作为流动相时, HEMA 峰型较差; 在水相中加入乙酸并逐步提高比例至 0.2% 时, 峰型得到最佳优化; 在甲醇、乙腈两种常用有机溶剂作为有机相过程中, 使用乙腈与使用甲醇响应值无明显区别, 但乙腈因具有较强的洗脱能力, 在缩短分析时间的同时能实现基线较好分离。本研究结果显示, 试验组与对照组的尿液中 HEMA 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示两种可能: (1) 对照组检出水平反映了人群尿液中 HEMA 基础水平, 试验组 EO 内暴露水平极低, 后续可通过扩大试验组岗位类别及调查范围进一步评估该群体 EO 内暴露水平; (2) 对照组检出水平未能反映人群尿液中 HEMA 基础水平, 对照组对象存在其他行为造成非 EO 接触导致的 HEMA 水平升高, 除接触丙烯腈、1,2-二溴乙烷和氯乙烯等化学物质外, 有文献报道吸烟也可导致尿液中 HEMA 水平升高^[14], 后续可通过问卷调查的方式全面了解拟纳入人群是否有可能影响 HEMA 水平升高的生活方式和相关化学物质的接触可能, 确保研究中对对照组检出水平能真实反映人群尿液中 HEMA 基础水平, 再通过扩大试验组岗位类别及调查范围等方式保证该群体 EO 真实内暴露水平得到准确评估。

本研究通过建立简便实用、便于推广的方法测定接触 EO 医务人员尿液中 HEMA 水平,初步获得 12 名接触 EO 医务人员尿液中的 HEMA 水平,为准确评估研究群体 EO 真实内暴露水平提供了可靠的技术方案,暴露水平的准确评估能为卫生健康管理部门的决策提供参考,也为我国医疗机构建设相关防护设施,配备相关防护用品,更好地保护接触 EO 医护群体健康提供准确数据支撑。

综上所述,通过优化前处理方式、色谱条件、质谱参数及定量方式,本研究所使用方法的线性范围、检出限、回收率与精密度等主要性能指标均满足《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》的要求,适用于接触 EO 医务人员尿液中 HEMA 水平的测定,所需仪器设备均较常见,便于推广。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 医疗器械生物学评价第 7 部分:环氧乙烷灭菌残留量;GB/T 16886. 7-2015[S]. 北京:中国标准出版社,2017:1.
- [2] YAHATA K, FUJISHIRO K, HORI H, et al. An investigation of symptoms in ethylene oxide sterilization workers in hospitals[J]. J Occup Health, 2001, 43(4): 180-184.
- [3] 马臻,左昕,孙冉,等. 1 例职业性急性环氧乙烷中毒鉴定案例思考[J]. 中国工业医学杂志,2017,30(1):79-80.
- [4] 王瀛,曹景鑫,蒋轶文. 职业性急性环氧乙烷中毒事故及典型病例分析[J]. 职业卫生与应急救援,2019,37(1):78-80.
- [5] 薄亚莉,王卉. 环氧乙烷健康危害研究现状[J]. 职业与健康,2019,35(15):2157-2160.
- [6] 刘晓晓,潘引君,叶开友,等. 上海市某区近 5 年急性职业中毒事故深度分析[J]. 职业卫生与应急救援,2020,38(2):187-190.
- [7] 赵晓鹏,骆彬,李增宁. 环氧乙烷中毒后神经精神障碍合并体重进行性增加 1 例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2020,38(9):703-704.
- [8] 中华人民共和国卫生部. 工作场所空气有毒物质测定:环氧化合物;GBZ/T 160. 58-2004[S]. 北京:人民卫生出版社,2004:5.
- [9] SCHETTGEN T, MUSIOL A, KRAUS T. Simultaneous determination of mercapturic acids derived from ethylene oxide (HEMA), propylene oxide (2-HPMA), acrolein (3-HPMA), acrylamide (AAMA) and N, N-dimethylformamide (AMCC) in human urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(17):2629-2638.
- [10] DING Y S, BLOUNT B C, VALENTIN-BLASINI L, et al. Simultaneous determination of six mercapturic acid metabolites of volatile organic compounds in human urine [J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22(6):1018-1025.
- [11] ALWIS K U, BLOUNT B C, BRITT A S, et al. Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UP-LC-ESI/MSMS) [J]. Anal Chim Acta, 2012, 750: 152-160.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 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;GBZ/T 210. 5-2008 [S]. 北京:人民卫生出版社,2008:7.
- [13] 中华人民共和国国家卫生健康委. 工作场所有害因素职业接触限值第 1 部分:化学有害因素;GBZ 2. 1-2019[S]. 北京:人民卫生出版社,2019:8.
- [14] CARMELLA S G, CHEN M L, HAN S M, et al. Effects of smoking cessation on eight urinary tobacco carcinogen and toxicant biomarkers[J]. Chem Res Toxicol, 2009, 22(4):734-741.

(收稿日期:2021-02-12 修回日期:2021-07-17)

(上接第 2757 页)

- [9] ZHAO N, LIU C C, QIAO W, et al. Apolipoprotein E, receptors, and modulation of Alzheimer's disease[J]. Biol Psychiatry, 2018, 83(4):347-357.
- [10] MAHLEY R W. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders[J]. J Mol Med (Berl), 2016, 94(7):739-746.
- [11] MARAIS A D. Apolipoprotein E in lipoprotein metabolism, health and cardiovascular disease[J]. Pathology, 2019, 51(2):165-176.
- [12] 王克勤. 脂蛋白与动脉粥样硬化(第 1 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1995:137-169.
- [13] 梁国威,李秀峰,徐旭,等. 血清小而密低密度脂蛋白胆固醇与脂肪肝相关性分析[J]. 医学研究杂志,2018,47(12):166-168.
- [14] NIU Z, ZHANG P, LI D, et al. Association of apolipoprotein E polymorphisms with white matter lesions and brain atrophy[J]. Psychiatry Investig, 2020, 17(2):96-105.
- [15] SING C F, DAVIGNON J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation[J]. Am J Hum Genet, 1985, 37(2):268-285.

(收稿日期:2021-03-12 修回日期:2021-08-27)