

职业接触三硝基甲苯的生物限值

1 范围

- 1.1 本标准规定了职业接触三硝基甲苯化合物的生物监测指标、生物限值及监测检验方法。
1.2 本标准适用于职业接触三硝基甲苯劳动者的生物监测。

2 生物监测指标和接触限值

生物监测指标和接触限值见表1。

表 1

生物监测指标	职业接触生物限值	采样时间
血中 4-氨基-2,6 二硝基甲苯-血红蛋白加合物	200 ng/g Hb	接触 4 个月后任意时间

3 监测检验方法

血中 4-氨基-2,6 二硝基甲苯-血红蛋白加合物的监测检验按附录 A 执行。

附录 A

(规范性附录)

血中 4-氨基-2,6 二硝基甲苯-血红蛋白加合物的竞争抑制性酶联免疫测定法

A.1 原理

4-氨基-2,6 二硝基甲苯(4A)是 TNT 在体内的主要代谢产物之一,在体内可与血红蛋白共价结合形成 4A-血红蛋白加合物(4A-Hb)。本实验利用抗原-抗体的竞争性抑制反应检测半抗原(4A-Hb)。将 4A-Hb 和一定量的等体积单克隆抗体(McAb)按照顺序加入到已经包被有检测抗原的(4A-BSA)酶联免疫测试板上,4A-Hb 与包被的 4A-BSA 对抗体产生竞争性结合反应。洗去未结合的抗体后,用酶标二抗与包被抗原的抗体相结合,再显色测定吸光度。吸光度与结合到酶标板上抗体的量成正比关系,与 4A-Hb 的量呈反比例关系。

A.2 仪器

A.2.1 酶联免疫检测仪,490 nm 波长。

A.2.2 离心机。

A.3 试剂

A.3.1 包被缓冲液:0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)。

A.3.2 底物缓冲液:柠檬酸-磷酸盐缓冲液(pH5.0)。

A.3.3 底物反应液:将邻苯二胺(OPD)5 mg 溶解在 10 mL 底物缓冲液中,临用前加入 15 μ L 体积分数为 30%的双氧水(H_2O_2)。

A.3.4 4A 标准液。

A.3.5 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体 HRP-IgG。

A.3.6 4A-Hb 单克隆抗体。

A.3.7 稀释液:含 5%小牛血清的 0.01 mol/L PBS 缓冲液。

A.3.8 4A-BSA 溶液。

A.3.9 酶标板洗涤液:含 0.1%吐温-20 的 0.01 mol/L PBS(pH7.4)。

A.4 样品采集、运输和保存

采集静脉血 1.0 mL,注入经肝素处理的试管中,混匀。

A.5 分析步骤

A.5.1 样品处理

将样品离心(800 g,5 min),将血浆吸出,向红细胞中加 3 mL 生理盐水于红细胞中混匀,离心(800 g,5 min)弃去上清液,反复洗涤 3 次。冰冻过夜,融化后剧烈振荡 5 min,使红细胞破裂释放出血红蛋白,1 000 g 离心 5 min,所得上清液即为待测样品。

A.5.2 样品测定与标准曲线的绘制:

- 将 BSA 用包被缓冲液稀释成 2 μ g/mL 后,在酶标板上每孔加入 100 μ L,4 $^{\circ}$ C 过夜。
- 每孔先加入 50 μ L 待测样品,再加入等体积的 1:10 000 的 4A-Hb 单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 保温 1.5 h 后,用酶标板洗涤液冲洗 4 次,在纸上拍干水滴。
- 每孔加入 RP-SAMG 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h,冲洗 4 次,拍干后加入底物反应液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 保

温 15 min。

- d) 每孔加入 50 μL 2 mol/L 的硫酸(H_2SO_4)中止反应,用 ELISA 仪测定 490 nm 吸光度值。
- e) 每块酶标板需要分别制作标准曲线,除了以不同浓度 4A 标准液代替样品外,其他所有操作步骤与样品一致。
- f) 计算以标准液浓度及其对应的吸光度百分值绘制标准曲线,根据每块酶标板的标准曲线计算出样品浓度。4A-Hb 加合物浓度以每克血红蛋白中含 4A 量表示。

A.6 说明

A.6.1 本方法的最低检出浓度为 100 ng/g Hb,测定范围为 100 ng/g~2 000 ng/g Hb。

A.6.2 回收率:加标量为 5,25,50,100,250,500 ng/mL 时,回收率分别为 101%,102%,103%,82%,99%,91%。

A.6.3 样品保存时间:4℃ 冰箱保存 10 d,浓度下降 2.6%。

附录 B
(资料性附录)
正确使用本标准的说明

B.1 适用范围

本标准适用于职业性接触三硝基甲苯劳动者的生物监测,如制造、运输、保管和使用硝酸炸药的劳动者。

B.2 生物监测指标的选择

通常情况下进入体内的三硝基甲苯经过体内代谢后,其主要代谢产物 4-氨基-2,6 二硝基甲苯(4A)可以与血红蛋白(Hb)结合形成 4A-Hb 加合物,4A-Hb 加合物与红细胞的生命周期一致,可以在体内存留 4 个月。研究发现 4A-Hb 与工人的接触剂量密切相关,是一个反映空气接触水平、皮肤污染和接触时间的生物监测指标。血中 4-氨基-2,6 二硝基甲苯(4A)与血红蛋白加合物是指三硝基甲苯的主要代谢产物与血红蛋白共价结合的复合物,可反映近 3~4 个月内 TNT 累积接触水平。

B.3 监测结果的评价

- B.3.1** 血中 4A-血红蛋白加合物既可以用于职业接触者的群体评价,也可用于个体评价。
- B.3.2** 当血中 4A-血红蛋白加合物超过职业接触生物限值时,表示劳动者有过量接触。
- B.3.3** 将血中 4A-血红蛋白加合物与工作场所环境监测结果结合起来,则可以全面评价工作场所劳动卫生条件和劳动者的接触状况。

B.4 监测检验要求

- B.4.1** 由于血中 4A-血红蛋白加合物在体内的生物半减期较长,因此对血样的采集时间未作严格规定。
- B.4.2** 由于酶联免疫测定方法高度的灵敏度和特异性,在测定过程中应当严格遵守酶联免疫测定的要求。

参 考 文 献

- [1] 刘玉瑛,李学琴,姚明,等.三硝基甲苯血红蛋白加合物与白内障的关系.中华劳动卫生职业病杂志,1995,13(5):259-261.
- [2] 刘玉瑛,李学琴,姚明,等.三硝基甲苯血红蛋白加合物与接触剂量的关系.中华劳动卫生职业病杂志,1995,13(5):257-259.
- [3] 宋文佳,王雅文,同慧芳,等.三硝基甲苯血红蛋白加合物与接触的关系,中华劳动卫生职业病杂志,2002,20(3):189-191.
- [4] 王雅文,刘琴芝,宋文佳,等.三硝基甲苯血红蛋白加合物的单克隆抗体检测方法.中华劳动卫生职业病杂志,1999,17(5):304-305.
- [5] 张瑞稳,薛寿征,王簪兰.区域比例取样测定全身体表农药污染总量.职业医学,1986,13(2):2.
- [6] Liu YY, Lu AYH, Stearne RA, et al. In vivo covalent binding of [¹⁴C] trinitrotoluene to proteins in the rats. Chem Biol Interactions 1992, 82:1-19.
- [7] Liu YY, Yao M, Fang JL, et al. Monitoring human risk and exposure to trinitrotoluene (TNT) using hemoglobin adduct as a biomarker. Toxicol Lett 1995. 77:281-287.
- [8] Gabriele S, Wei JF, Liu YY, et al. Determination of hemoglobin adducts in workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. J Chromatogr B. 1996, 682:243-248.
-