

顶空气相色谱和气相色谱-质谱联用法检测血液中的二氯甲烷*

廖勇¹, 范玮豪², 卢翔¹, 袁妍娇¹, 李昌艳¹, 柳怡帆¹, 李进财¹, 叶懿², 廖林川^{2Δ}

1. 四川基因格司法鉴定中心(成都 610041); 2. 四川大学华西基础医学与法医学院(成都 610041)

【摘要】目的 建立血液中二氯甲烷的气相色谱-质谱(GC-MS)定性检测和顶空气相色谱(HS-GC)定量检测方法, 为二氯甲烷中毒或致死案件的法医学鉴定和分析提供可靠依据。**方法** 取0.5 mL血液, 以氯仿为内标, 加入到顶空瓶, 经65 °C加热后抽取瓶中气体用GC-MS进行定性方法学验证, 用HS-GC进行定量方法学验证, 并将该方法应用于案件鉴定。**结果** GC-MS定性验证: 空白血液中无干扰, 添加血样中二氯甲烷色谱峰特异且峰型良好, 质谱特征碎片离子特异; 方法检出限(LOD)为5 μg/mL。HS-GC定量验证: 二氯甲烷与乙醇等常见挥发性化合物色谱峰分离良好, 分离度均>1.5; 方法定量限(LOQ)为20 μg/mL, 在20~1 000 μg/mL范围内线性关系良好, $R>0.999$; 日内/日间精密度良好(RSD 均<15%), 准确度高(相对误差 $\delta<15\%$)。2例二氯甲烷致死案件死者血液中均检出二氯甲烷, 质量浓度分别为470 μg/mL、915 μg/mL。**结论** 该方法快速、稳定且结果可靠, 可用于疑似二氯甲烷中毒或致死案件血液中二氯甲烷的法医毒物学定性定量分析。

【关键词】 法医毒物学 二氯甲烷 顶空气相色谱 气相色谱-质谱 血液

Determination of Dichloromethane in Blood with Headspace Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry LIAO Yong¹, FAN Wei-hao², LU Xiang¹, YUAN Yan-jiao¹, LI Chang-yan¹, LIU Yi-fan¹, LI Jin-cai¹, YE Yi², LIAO Lin-chuan^{2Δ}. 1. Sichuan Genegle Forensic Examination Center, Chengdu 610041, China; 2. West China School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Δ Corresponding author, E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn

【Abstract】Objective To establish a method for qualitative determination of dichloromethane (DCM) in blood by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and quantitative determination of DCM in blood by headspace gas chromatography (HS-GC), and to provide reliable support for forensic examination and analysis of poisoning or deaths caused by DCM. **Methods** 0.5 mL blood sample was collected, added into headspace vial with chloroform as the internal standard, and processed by heating at 65 °C and evacuation treatment. The intermediate gas in the headspace vial was analyzed by GC-MS for qualitative validation of the method and by HS-GC for quantitative validation of the method. The method was then applied in forensic case analysis. **Results** Qualitative validation of the examination method by GC-MS found that the chromatographic peak and mass spectral characteristic ions were specific in samples added with DCM, and that no interference was observed in the blank negative samples. The limit of detection (LOD) was 5 μg/mL. Quantitative method validation by HS-GC found that the chromatographic peak of DCM was well separated from those of eight other volatile compounds, with the resolution>1.5 in all cases; the lower limit of quantification (LOQ) was 20 μg/mL and good linearity was shown within the range of 20 and 1 000 μg/mL, $R>0.999$; the intra-day test precision and inter-day test precision were good (relative standard deviation, or $RSD<15\%$ for both) and test accuracy was high (relative error, or $\delta<15\%$). With the method established in the study, DCM was detected successfully in the blood of two fatal cases caused by DCM poisoning, with the blood concentration being 470 μg/mL and 915 μg/mL, respectively. **Conclusion** This method is shown to be a rapid, stable and accurate approach to the qualitative and quantitative forensic and toxicological analysis of DCM in blood in DCM poisoning cases or deaths caused by DCM.

【Key words】 Forensic toxicology Dichloromethane Headspace gas chromatography Gas chromatography-mass spectrometry Blood

二氯甲烷(dichloromethane, DCM; CH_2Cl_2 ; CAS No.75-09-2)属于氯代甲烷家族, 是无色、透明、易挥发液体, 微溶于水、易溶于有机溶剂, 对生物体有毒性, 目前归为二类致癌物^[1]。除自然界可产生少量的二氯甲烷外, 每年全球有100万吨以上的二氯甲烷由人类工业化产生^[1],

作为有机溶剂广泛应用于航天、电子、胶片、医药等领域的化学合成、提取、纯化和金属清洗^[1-2]。二氯甲烷可通过呼吸、吞食和皮肤吸收三种途径进入人体, 由于其不稳定性, 环境中二氯甲烷主要存在于空气中, 因此呼吸为主要途径。人体吸入二氯甲烷后, 呼吸和中枢神经系统受损, 导致头晕、恶心、呕吐等症状, 高浓度的职业暴露可导致共济失调、意识丧失甚至死亡^[3-5]。

* 四川省科技厅重点研发项目(No. 2019YFS0066)资助

Δ 通信作者, E-mail: linchuanliao@scu.edu.cn

随着二氯甲烷对于环境和人体危害日益积累和显现,并鉴于氯代甲烷家族在非正常死亡、性侵案件方面的不断报道^[5-7],有必要建立快速、稳定、准确并适用于法医分析的氯代甲烷实验室检测方法。目前国内报道的二氯甲烷检测方法均为顶空气相色谱法^[8-9],且应用集中在环境监测、卫生健康领域,未见基于气相色谱-质谱法定性和气相色谱法定量的法医学检测应用。本文使用顶空气相色谱和气相色谱-质谱联用法,建立了血液中二氯甲烷定性定量的快速、稳定检测方法,并成功应用于2例二氯甲烷致死案件的法医毒物学检测和分析。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

Trace 1300/ISQD气相色谱-质谱(美国ThermoFisher公司);7697A/8860顶空气相色谱(美国Agilent公司);天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);超纯水系统(四川优普越纯科技有限公司);二氯甲烷标准品(德国Dr.Ehrenstorfer公司);甲醇、乙醇、乙醛、丙酮、正丙醇、异丙醇、正丁醇和氯仿(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);高纯氮气(99.999%,成都鸿浩源气体有限公司)。

1.2 仪器条件

色谱条件(定性):Agilen GS-CarbonPLOT色谱柱(30 m×0.32 mm×3 μm),柱温程序:100 ℃(保持0 min),以15 ℃/min的速率升温至220 ℃(保持4 min);高纯氮气作载气,流速1 mL/min,分流比20:1;进样口温度200 ℃。

质谱条件(定性):传输线温度230 ℃;电子轰击离子源(EI),电子能量70 eV;离子源温度230 ℃;全扫描模式(SCAN),扫描质量数范围10~200 amu。

顶空条件(定量):加热箱温度65 ℃,定量环温度105 ℃,传输线温度110 ℃,样品瓶加热平衡时间10 min,样品瓶加压时间0.1 min,定量环充满时间0.1 min,定量环平衡时间0.05 min,进样时间1 min。

色谱条件(定量):色谱柱DB-ALC1(30 m×0.32 mm×1.8 μm),色谱柱DB-ALC2(30 m×0.32 mm×1.2 μm),柱温40 ℃;高纯氮气作载气,流速3 mL/min,分流比20:1;进样口温度200 ℃;双FID检测器,检测器温度均为250 ℃。

1.3 样品前处理

取0.5 mL血液,加入到有0.5 mL含有内标工作液(氯仿:0.2 mg/mL)的10 mL顶空瓶内,立即压盖,轻微摇匀,放置于65 ℃水浴10 min,手动进样针抽取瓶内中层气体100 μL进GC-MS定性检测,或将顶空瓶压盖后置于顶空自动进样器,用HS-GC进行定量检测。

1.4 方法验证

1.4.1 选择性 本研究获得成都新基因格医学检验所伦理委员会批准(批准号2020年第01号)。取来源于健康志愿者的空白血10份(均签署了知情同意书)、添加了二氯甲烷的空白血3份(二氯甲烷质量浓度:1 mg/mL)、添加了混标的空白血3份(二氯甲烷、甲醇、乙醇、乙醛、丙酮、正丙醇、异丙醇、正丁醇和氯仿各组分质量浓度:1 mg/mL),按照1.2、1.3方法进行前处理和GC-MS或HS-GC检测。GC-MS:空白血无干扰,同时二氯甲烷空白添加中的二氯甲烷色谱峰、质谱特征碎片离子特异,保留时间稳定,视为选择性良好。HS-GC:空白血无干扰,同时混标空白添加中的二氯甲烷、甲醇、乙醇、乙醛、丙酮、正丙醇、异丙醇、正丁醇和氯仿色谱峰峰型良好、保留时间稳定,且二氯甲烷与乙醇等8种化合物分离度 $R \geq 1.5$,视为选择性良好。

1.4.2 检出限和定量限 空白血中添加二氯甲烷,分别制得质量浓度为1、2、5、10、20 μg/mL的系列样品,按照1.2、1.3方法进行前处理和GC-MS检测(检出限)或HS-GC检测(定量限),每个质量浓度3次平行。以GC-MS信噪比(signal to noise ratio, S/N) ≥ 3 的最低质量浓度为方法检出限(limit of detection, LOD);以HS-GC信噪比(S/N) ≥ 10 ,且精密度指标RSD(relative standard deviation) $< 15\%$ 、准确度指标相对误差 $\delta < 20\%$ 的最低质量浓度为方法定量限(limit of quantification, LOQ)。

1.4.3 线性范围 空白血中添加二氯甲烷,分别制得质量浓度为20、50、100、200、500、800、1000 μg/mL的系列样品,按照1.2、1.3方法进行前处理和HS-GC检测,每个浓度3次平行。以二氯甲烷质量浓度为横坐标,二氯甲烷与氯仿色谱峰峰面积比为纵坐标建立一元线性回归方程,相关系数 $R \geq 0.999$ (或 $R^2 \geq 0.998$)视为线性良好。

1.4.4 精密度和准确度 空白血中添加二氯甲烷,分别制得低、中、高质量浓度(50、200、800 μg/mL)的样品,按照1.2、1.3方法在同一天内进行前处理和HS-GC检测,每个质量浓度6次平行,连续3 d重复。以二氯甲烷与氯仿色谱峰峰面积比,带入线性方程计算测定值,再分别计算每种质量浓度日内、日间精密度(以RSD表示), $RSD < 15\%$ 视为合格。以每种质量浓度二氯甲烷与氯仿色谱峰峰面积比,带入线性方程计算测定值,再计算 δ , $\delta < 15\%$ 视为合格。

2 结果

2.1 选择性

2.1.1 GC-MS 二氯甲烷空白血添加的总离子流色谱图(total ion chromatogram, TIC)如图1A所示,目标物二氯

甲烷的保留时间(Rt)为6.395 min, 峰型对称, 无杂峰干扰, 与内标氯仿(Rt: 9.674 min)分离良好; 质谱图如图1B所示, 二氯甲烷特征碎片离子为 m/z 84、86、49、51等, 并经谱库搜索比对确认(匹配度为902, 如图1C所示)。

空白血的TIC如图1D所示, 内标氯仿正常出峰, 二氯甲烷出峰时间段无峰, 表明该方法专属性强、特异性好, 血液中内源性物质对二氯甲烷的检测无干扰。

2.1.2 HS-GC 空白基质无干扰, 空白添加二氯甲烷的Rt分别为2.965 min(A柱)、2.842 min(B柱), 峰型对称, 与甲醇、乙醇、乙醛、丙酮、正丙醇、异丙醇、正丁醇和氯仿的分离度R值在3.1~86.1之间, 均>1.5, 二氯甲烷的检测不受常见挥发性化合物的干扰, 如图2所示。

2.2 检出限、定量限和线性范围

系列质量浓度的二氯甲烷空白血添加分别进GC-MS检测, $S/N \geq 3$ 且稳定的最低质量浓度为5 $\mu\text{g/mL}$, 即定

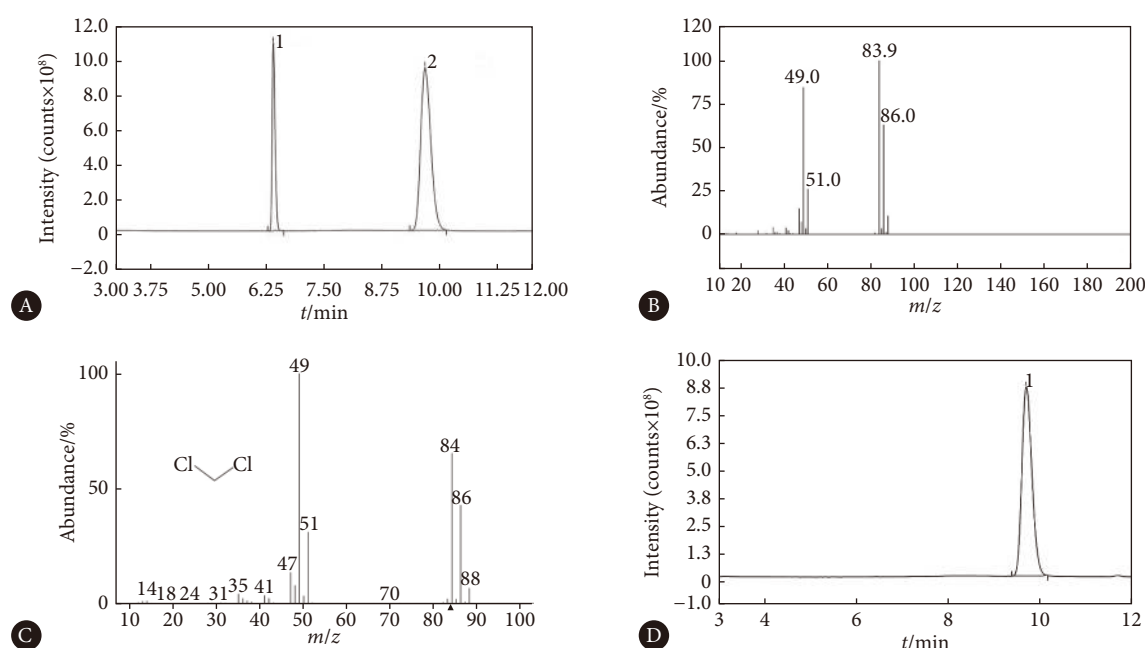


图1 二氯甲烷空白血添加在GC-MS的总离子流色谱图及质谱图

Fig 1 Total ion chromatogram (TIC) and mass spectrometry (MS) of blank blood added with dichloromethane

A: TIC of blank blood added with dichloromethane (1: dichloromethane; 2: chloroform); B: MS of blank blood added with dichloromethane; C: Library searching of dichloromethane; D: TIC of blank blood (1: chloroform).

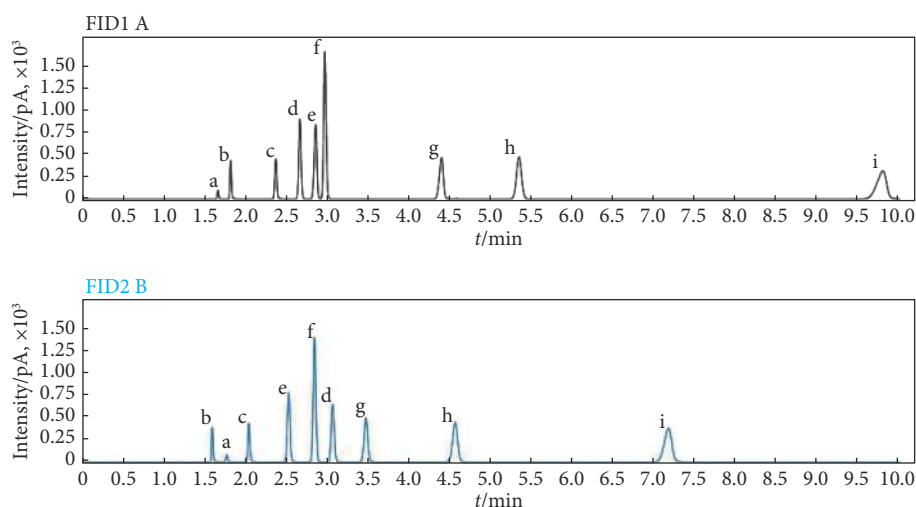


图2 二氯甲烷与乙醇等8种挥发性化合物在HS-GC双色谱柱上的分离情况

Fig 2 Resolution of dichloromethane and eight other common solvents on two columns of headspace gas chromatography (HS-GC)

a: Acetaldehyde; b: Methanol; c: Ethanol; d: Acetone; e: Isopropanol; f: Dichloromethane; g: N-propanol; h: Chloroform; i: N-butanol. FID: Flame ionization detector.

为该方法LOD; 进HS-GC检测, $S/N \geq 10$ 的最低质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$, 其精密度指标RSD分别为0.29%(A柱)和0.64%(B柱), 均 $< 15\%$, 其准确度指标相对误差 δ 分别为15.73%(A柱)和15.83%(B柱), 均 $< 20\%$, 故该质量浓度定为方法LOQ。

经HS-GC检测, 血液中二氯甲烷在20 ~ 1000 $\mu\text{g/mL}$ 范

围内线性关系良好, 线性方程分别为 $y = 0.0179x + 0.0623$ ($R^2 = 0.9985$, A柱)、 $y = 0.018x + 0.0656$ ($R^2 = 0.9984$, B柱)。

2.3 精密度和准确度

低、中、高质量浓度的二氯甲烷添加经HS-GC重复和连续检测, 如表1所示, 3种质量浓度的日内精密度/日间精密度和准确度, 在A、B柱上均符合要求。

表 1 方法的精密度和准确度

Table 1 The precision and accuracy of the method

Added concentration/($\mu\text{g/mL}$)	Two columns of HS-GC	Intra-day precision (RSD, $n=6$)	Inter-day precision (RSD, $n=18$)	Accuracy (δ , $n=18$)
50	FID1 A	3.21%	3.94%	12.04%
	FID2 B	3.72%	3.34%	11.57%
200	FID1 A	0.49%	6.31%	6.27%
	FID2 B	0.34%	5.99%	5.97%
800	FID1 A	2.19%	10.60%	1.11%
	FID2 B	2.36%	10.58%	1.23%

FID: Flame ionization detector.

2.4 案件应用

按照本文建立的方法, 对2例疑似职业暴露中毒致死的化工厂职工提取心血, 进行二氯甲烷定性定量检测和分析。2例死者血液中均检出二氯甲烷成分, 质量浓度分别为470 $\mu\text{g/mL}$ 、915 $\mu\text{g/mL}$, 血样在双柱上定量结果的RSD值分别为0.05%、0.3%, 碳氧血红蛋白饱和度分别达到14.8%和13.3%。结合法医病理学分析, 符合因二氯甲烷中毒导致缺氧窒息而死亡。

3 讨论

二十世纪八十年代以前, 二氯甲烷主要作为麻醉和镇静剂用于医学领域, 由于其良好的有机物溶解性能, 逐渐在医药、化工等行业广泛使用, 不仅对环境造成较严重污染, 同时职业暴露和误吸导致的中毒和致死案件不断有报道, 其毒性逐渐显现, 危害不容小觑。据美国毒物控制中心协会(AAPCC)记录, 1985–2017年美国有37 201例二氯甲烷中毒事件; 1980–2018年有85例致死案件报道, 大部分为职业暴露导致, 如使用二氯甲烷作为油漆去除剂、脱脂剂、粘合剂等^[5]。国内尚未有针对二氯甲烷中毒和致死事件的回顾性统计分析, 但急、慢性中毒事故持续有报道^[4, 6, 10], 如使用二氯甲烷作为除锈剂、误吸等导致中毒或死亡。因此, 对疑似二氯甲烷中毒或致死案件中生物检材检测方法的探索优化和应用具有法医学实践意义。

由于二氯甲烷的易挥发性(沸点约40 $^{\circ}\text{C}$), 目前针对生物检材中二氯甲烷的主要检测方法为气相色谱法^[8], 但仅靠色谱进行定性, 特异性相对较差, 缺乏快速、准确的定性方法。LOPES等^[11]报道了一种利用二氯甲烷作为启

动子的生物荧光法, 可在1.3 ~ 2.3 h内完成对空气中二氯甲烷和其液体的快速定性检测, 而针对生物检材的快速、准确定性检测, 国内还未有质谱法应用报道。本研究以法医鉴定实践中常见的血液样本为检测对象, 通过仪器设备参数优化, 以保留时间、特征碎片离子和谱库分析为依据, 建立了快速、准确的气相色谱-质谱定性方法, 同时建立了匹配的顶空气相色谱定量方法, 在不同色谱柱上均得到了方法学验证。与已报道方法^[8]相比, 本方法不仅增加了质谱定性确证, 且对前处理条件进行了优化(如所需样本量、平衡时间更少), 分离度更好(如二氯甲烷与氯仿的分离度在双柱上分别达到46.4和33.2), 定量曲线更为合理(内标-校准曲线法), 以本文案例应用为例, 2名死者血样在双柱上定量结果的RSD值分别为0.05%、0.3%, 表明该定量方法稳定、可靠, 可用于疑似二氯甲烷中毒或致死案件的毒物学检测分析。

血液中二氯甲烷的定性定量检测是分析判断二氯甲烷中毒或致死案件的主要依据, 同时实践中还需结合其体内代谢物检测和病理学表现综合研判。在以往国内外报道的致死案例中, 血液中二氯甲烷质量浓度集中在18 ~ 223 $\mu\text{g/mL}$ 范围^[5, 8, 12], 两例报道为378 $\mu\text{g/mL}$ 和2 200 $\mu\text{g/mL}$ ^[5], 本文2例案例中定量质量浓度为470 $\mu\text{g/mL}$ 、915 $\mu\text{g/mL}$, 均达到较高的致死浓度。二氯甲烷在体内主要通过细胞色素P450和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)途径介导代谢为一氧化碳和二氧化碳^[1], 检测2例死者(不吸烟)血样中碳氧血红蛋白饱和度, 分别达到14.8%和13.3%, 与以往报道数据符合^[5]。以上理化检验结合病理所见(多器官瘀血/出血、水肿等)和案发情况(在含二氯甲烷密闭空间作业),

认为2例死亡原因符合二氯甲烷急性中毒昏迷导致缺氧窒息而死,稍显遗憾的是未对死者脑、肺、肝、肾等组织器官进一步检验分析。

由于二氯甲烷的持续广泛应用,应重视对职业暴露人员的健康监测和该类事故的法医毒物学检测,本研究建立了一种快速、稳定、可靠的血液中二氯甲烷的气相色谱-质谱定性和顶空气相色谱定量检测方法,并成功应用于案件分析,为二氯甲烷的临床和法医学检测应用提供了参考和借鉴。

* * *

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] DEKANT W, JEAN P, ARTS J. Evaluation of the carcinogenicity of dichloromethane in rats, mice, hamsters and humans. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2021, 120: 104858[2021-12-02]. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104858>.
- [2] SCHLOSSER P M, BALE A S, GIBBONS C F, *et al.* Human health effects of dichloromethane: Key findings and scientific issues. *Environ Health Perspect*, 2015, 123(2): 114-119.
- [3] KOBAYASHI A, ANDO A, TAGAMI N, *et al.* Severe optic neuropathy caused by dichloromethane inhalation. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2008, 24(6): 607-612.
- [4] 尹灵富, 顾卫新, 尹月英, 等. 一起二氯甲烷急性职业中毒事件调查. *浙江预防医学*, 2012, 24(1): 51-52.
- [5] HOANG A, FAGAN K, CANNON D L, *et al.* Assessment of methylene chloride-related fatalities in the United States, 1980-2018. *JAMA Intern Med*, 2021, 181(6): 797-805.
- [6] 刘克林, 徐婉. 吸入二氯甲烷和氯仿中毒后溺水死亡案例的法医毒物学分析. *中国法医学杂志*, 1994, 9(4): 230-232.
- [7] GAILLARD Y, MASSON-SEYER M F, GIROUD M, *et al.* A case of drug-facilitated sexual assault leading to death by chloroform poisoning. *Int J Legal Med*, 2006, 120(4): 241-245.
- [8] 刘克林, 于忠山, 冯育, 等. 二氯甲烷和氯仿中毒的顶空气相色谱分析法. *中国法医学杂志*, 1993, 8(1): 32-35.
- [9] 赵彩莲, 安英智, 高伟. 车间空气中二氯甲烷的气相色谱测定. *职业与健康*, 2002, 18(12): 29-30.
- [10] 纪天鹏, 益琼. 一起急性二氯甲烷中毒事故调查. *中国工业医学杂志*, 2019, 32(2): 159.
- [11] LOPES N, HAWKINS S A, JEGIER P, *et al.* Detection of dichloromethane with a bioluminescent (lux) bacterial bioreporter. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2012, 39(1): 45-53.
- [12] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Fatal exposure to methylene chloride among bathtub refinishers - United States, 2000-2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2012, 61(7): 119-122.
- (2021-12-09收稿, 2022-08-05修回)
- 编辑 吕 熙