

离子色谱法快速测定人尿中的硫氰酸盐

郭爱华, 袁佗, 王玮

摘要: [目的] 建立离子色谱法测定人尿中硫氰酸盐的快速检测方法。[方法] 超纯水稀释尿样, 离心后过0.22 μ m滤膜, 经IonPac NG1预柱在线净化, 再经IonPac AS16阴离子柱分离, 用KOH洗脱, 流速为1.0 mL/min, 电导检测器检测, 外标法定量。并对实验条件进行了优化, 考察了方法的检出限、稳定性、准确度及精密度等参数。[结果] 硫氰酸盐的质量浓度在0.10~25.0 mg/L的范围内与其峰面积呈线性关系, 相关系数为0.999 8, 方法检出限(LOD)为0.04 mg/L, 定量限(LOQ)为0.10 mg/L。在0.5、5.0、20 mg/L 3个浓度水平进行加标回收试验, 回收率为96.6%~105.1%, 相对标准偏差($n=6$)为1.3%~2.6%。[结论] 该方法简单、快速、准确, 适合于人尿中硫氰酸盐含量的测定。

关键词: 离子色谱法; 快速测定; 人尿; 硫氰酸盐

Rapid Determination of Thiocyanate in Human Urine by Ion Chromatography GUO Ai-hua, YUAN Tuo, WANG Wei (Physical and Chemical Section, Xicheng District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100120, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a method for rapid determination of thiocyanate in urine by ion chromatography. [Methods] The urine samples were diluted by water, then centrifugated and filtered through 0.22 μ m membrane, following by online purification with IonPac NG1 pre column. The purified samples were separated through an IonPac AS16 anion column and eluted by KOH with a flow rate at 1.0 mL/min. Thiocyanate was detected by conductivity detector, and quantification was determined by external standard method. The experimental conditions were optimized, and the parameters of the proposed method including detection limit, stability, accuracy, and precision were calculated. [Results] A linear relationship was found between the values of peak area and the mass concentrations of thiocyanate in the range of 0.10-25.0 mg/L. The correlation coefficient was 0.999 8, the limit of detection (LOD) was 0.04 mg/L, and the limit of quantification (LOQ) was 0.10 mg/L. The recovery rates were in the range of 96.6%-105.1% at three spiked concentrations of 0.5, 5.0, and 20 mg/L, with relative standard deviations ($n=6$) ranging from 1.3% to 2.6%. [Conclusion] This simple, rapid, and accurate method is suitable for determination of thiocyanate in human urine.

Key Words: ion chromatography; rapid determination; human urine; thiocyanate

尿中硫氰酸盐含量增高是接触氰化物的一项生物接触指标^[1]。近年来, 急性氰化物中毒事件常有报道^[2-5], 因此建立简单、快速、灵敏、准确的尿中硫氰酸盐的检测方法势在必行。目前, 尿中硫氰酸盐的检测方法主要有分光光度法、气相色谱法、离子色谱法等。1996年卫生部发布的WS/T 39—1996《尿中硫氰酸盐的吡啶-巴比妥酸分光光度测定方法》推荐标准为吡啶-巴比妥酸分光光度法^[6], 该法反应时间长, 应用试剂不稳定, 操作繁琐, 精密度、准确度不佳; 冯翠霞等^[7]利用异烟酸-吡唑酮分光光度法测定尿中硫氰酸盐, 该方法避免了使用吡啶产生恶臭味, 但

方法所用试剂多, 受显色温度和显色时间影响较大, 且异烟酸-吡唑酮不但能与硫氰酸根(SCN^-)反应, 同样能与氰化物(CN^-)反应。武和平等^[8]与钟良康等^[9]采用顶空气相色谱法测定尿中硫氰酸盐, 该法具有简便、价廉、实用、灵敏度高、准确性好、干扰少等优点, 但采用该方法硫氰酸盐须在酸性介质下衍生化反应后进行测定, 受pH值和衍生化试剂用量影响较大, 顶空平衡时间长达30 min, 不利于氰化物中毒患者尿样的快速检测。相较于前两种方法, 离子色谱法弥补了上述缺陷, 邵国健等^[10]采用离子色谱法直接测定尿中的硫氰酸盐, 方法简单、快速、灵敏、回收率高、特异性强, 尿中的氟离子、氯离子、硫酸根、硝酸根对 SCN^- 不造成干扰。为建立一种既能满足氰化物中毒患者尿中硫氰酸盐测定又适用于健康正常人群和职业接触人群尿中硫氰酸盐含量测定的简单快

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14602

[作者简介] 郭爱华(1981—), 男, 本科, 学士, 主管检验师; 研究方向: 食品、环境、职业卫生等理化检验; E-mail: gah_yjx@163.com

[作者单位] 西城区疾病预防控制中心理化检验科, 北京 100120

速且方法检出限低的方法,本文采用超纯水稀释尿样,离心后过0.22 μm 滤膜, IonPac NG1 预处理柱在线净化,离子色谱法分离检测尿中硫氰酸盐,结果表明该方法简单、快速、灵敏、准确,适合于尿中硫氰酸盐的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ICS-2100型离子色谱仪,配AS-DV自动进样器、EGC III 氢氧化钾自动发生器(美国热电公司)。抑制器:ASRS 300(4 mm),DS6电导检测器, IonPac NG1 预柱(4 $\times$ 35 mm)(均为美国热电公司);LG10-2.4A型高速离心机(中国北京医用离心机厂);一次性0.22 μm 滤膜(中国上海安谱科学仪器有限公司);硫氰酸钠(美国Sigma公司,纯度 $\geq 99.99\%$,CAS=540-72-7);超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱:保护柱 IonPac AG16(4 $\times$ 50 mm),分析柱 IonPac AS16(4 $\times$ 250 mm)(美国热电公司);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;抑制器模式为外接水电抑制,电流124 mA;电导池温度:35 $^{\circ}\text{C}$;淋洗液:KOH 0~15 min, 35 mmol/L; 15.1~18 min, 70 mmol/L; 18.1~23 min, 35 mmol/L;流速:1.0 mL/min;进样体积:25 μL 。

1.3 标准曲线的制备

标准使用液的配制:准确称取已烘干的硫氰酸钠(纯度 $\geq 99.99\%$)标准品0.1366 g,用少量超纯水溶解后于100 mL容量瓶中,用超纯水定容至刻度,即得1000 mg/L SCN^- 标准储备液。准确吸取标准储备液10.00 mL置于100 mL容量瓶中,用超纯水定容至刻度,配制成浓度为100.0 mg/L SCN^- 标准使用液。

标准系列的配制:准确吸取 SCN^- 标准使用液0.10、0.50、1.0、5.0、10.0、25.0 mL于100 mL容量瓶中,用超纯水定容至刻度,配制成浓度为0.10、0.50、1.0、5.0、10.0、25.0 mg/L标准系列。以保留时间定性,以测得的峰面积对 SCN^- 浓度绘制标准曲线。

1.4 尿样制备

正常人混合尿:本实验用聚乙烯塑料瓶采集10名正常人尿各约50 mL,置于具塞玻璃瓶中充分混匀。

1.5 样品处理

用聚乙烯塑料瓶采集尿样,混匀后立即测量尿比重。准确吸取10.00 mL尿样于100 mL容量瓶中,用超

纯水定容至刻度,10000 r/min离心过0.22 μm 滤膜后上机测定。尿样保存于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

2 结果

2.1 前处理条件的优化

本实验采用纯水稀释尿样,当稀释因子低于10时,尿样中基质电导率值过高,在 SCN^- 出峰时,电导率不能回到基线水平,会影响 SCN^- 的积分定量,考虑到检测的灵敏度,故本实验采用尿样稀释10倍。

2.2 进样体积的选择

本实验分别以25和100 μL 进样体积进行测定,结果两种进样体积 SCN^- 均能得到有效分离,但以100 μL 进样体积检测大于10 mg/L SCN^- 时,出现峰型变宽拖尾现象,影响保留时间的重现性和定量准确性。以25 μL 进样体积进行检测,灵敏度已满足检测要求,故选择25 μL 进样。

2.3 色谱条件的优化

SCN^- 属于疏水性阴离子,在阴离子色谱柱上有较强保留^[11],而尿样成分复杂,所以当淋洗液浓度低时,分析时间较长;当淋洗液浓度高时,影响杂质峰与目标峰的分离效果。因此经试验,选择35 mmol/L氢氧化钾进行等度洗脱, SCN^- 在13 min出峰, SCN^- 与杂质实现了有效分离,并缩短了分析时间。 SCN^- 出峰后,为使尿样中其他强保留离子尽快洗脱出来,在15 min后使用70 mmol/L浓度氢氧化钾淋洗3 min,然后回到35 mmol/L平衡5 min,从而避免影响下一个样品的测定。见图1,图2,图3。

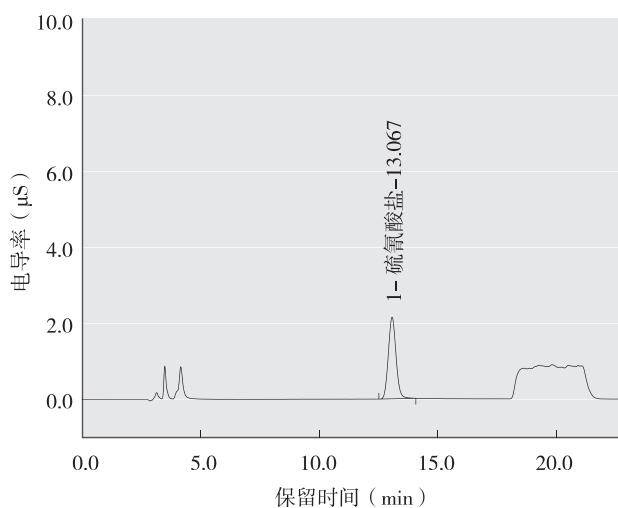


图1 硫氰酸盐标准色谱图(5.0 mg/L)

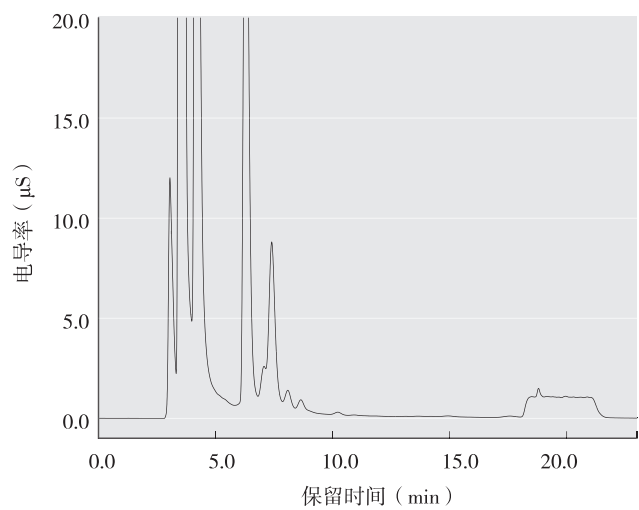


图2 本底尿样色谱图

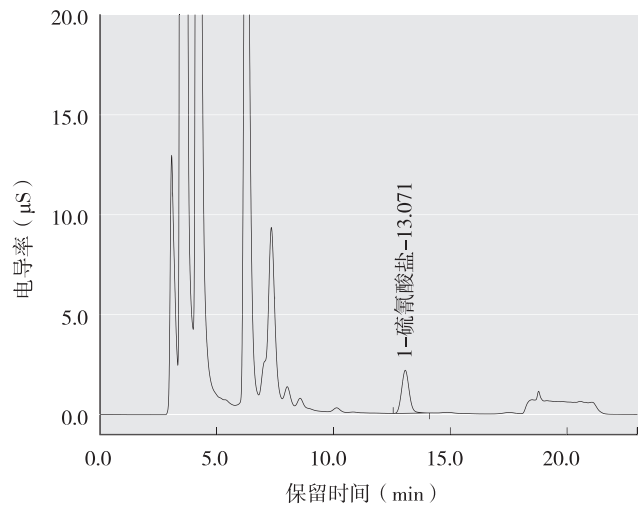


图3 加标尿样(5.0 mg/L)色谱图

2.4 尿中 SCN⁻ 稳定性试验

行业标准 WS/T 39—1996《尿中硫氰酸盐的吡啶-巴比妥酸分光光度测定方法》规定测定的尿样必须是新鲜的,放4℃冰箱第2天后测定结果偏低,尿样应在4 h内测定^[6]。本实验以加标正常人混合尿(5.0 mg/L)来测定尿中 SCN⁻ 稳定性,将加标正常人混合尿(5.0 mg/L)置于4℃冰箱,分别于0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h 采用本方法进行测定,检测结果分别为5.04, 5.07, 5.01, 5.10, 5.12, 5.05, 5.08, 5.06 mg/L,平均值为5.07 mg/L,标准偏差(*s*)为0.0346 mg/L,变异系数(*CV*)为0.68%。

2.5 线性范围、相关系数与检出限

按试验方法对0.10, 0.50, 1.0, 5.0, 10.0, 25.0 mg/L 硫氰酸盐标准系列进行测定,以硫氰酸盐浓度(mg/L)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。线性回归方程为 $\hat{y}=0.1654x-0.0255$,相关系数 $r=0.9998$ 。结果

表明,硫氰酸盐的质量浓度在0.10~25.0 mg/L 的范围内与其峰面积呈线性关系。以3倍信噪比(3N/b)计算最低检出浓度为0.004 mg/L,当取样量为10 mL,定容至100 mL时,方法的检出限为0.04 mg/L;以10倍信噪比(10N/b)计算定量限为0.10 mg/L。

2.6 准确度与精密度实验

以混合尿液为本底,分别加入0.5、5.0和20 mg/L 硫氰酸盐标准溶液,每个浓度水平做6次平行,计算加标回收率。结果见表1。硫氰酸盐的加标回收率为96.6%~105.1%,相对标准偏差为1.3%~2.6%。

表1 准确度和精密度实验结果(*n*=6)

项目	加标浓度 ρ /(mg/L)	回收率范围(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
硫氰酸盐	0.5	96.6~103.6	100.7	2.6
	5.0	98.0~104.3	101.1	2.5
	20.0	101.2~105.1	103.7	1.3

3 讨论

本实验采用纯水稀释尿样,离心后过0.22 μm 滤膜,经 IonPac NG1 预柱在线净化,离子色谱法分离和检测尿中硫氰酸盐,建立了尿中硫氰酸盐的分析方法。本方法采用 IonPac NG1 预柱在线净化,该预处理柱内填充物与 OnGuard RP 柱相同,在保护柱和分离柱前连接 IonPac NG1 预柱,既可去除尿样中的有机物,又能摆脱手工固相萃取(SPE)净化^[11],有效提高工作效率,减少分析时间。同时,对阴离子柱有一定的保护作用。此外实验结果表明:采用离子色谱法测定尿中硫氰酸盐,方法有较好的稳定性,降低了样品采集时效性的要求,也为尿样的复测提供了可靠方法。实验结果显示本方法检出限(LOD)为0.04 mg/L,定量限(LOQ)为0.10 mg/L,回收率为96.6%~105.1%,相对标准偏差(*n*=6)为1.3%~2.6%。结果表明该方法无需配制试剂,操作简单、快速,线性范围宽,适用于急性氰化物中毒的应急检测;同时方法准确度和精密度好,检出限和定量限低,也适用于健康正常人群^[12-13]和职业接触人群^[14]尿中硫氰酸盐含量的检测。但该方法仅以保留时间进行定性,对于基质复杂的尿样定性易出现偏差,不利于氰化物中毒的诊断与确认,因此方法应在硫氰酸盐定性方面加以改进,如采用双色谱柱定性,或应用其他检测方法对实验结果进行验证。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. GBZ 209—2008 职业性急性氰化物中毒诊断标准[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [2] 赵文玲. 19例急性氰化物中毒病人的护理体会[J]. 职业与健康, 2010, 26(20): 2400.
- [3] 朱晓莉, 王涤新, 翟明芬, 等. 急性氰化物中毒患36例临床分析[J]. 中国职业医学, 2011, 38(1): 41-43.
- [4] 余强. 急性氰化物中毒并发呼吸衰竭急诊救治分析[J]. 中国医学工程, 2013, 21(5): 160-160.
- [5] 杜菊媛. 4例急性氰化物中毒患者的护理[J]. 护理学报, 2013, 20(22): 54-55.
- [6] 中华人民共和国卫生部. WS/T 39—1996 尿中硫氰酸盐的吡啶-巴比妥酸分光光度测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997.
- [7] 冯翠霞, 林丽玲, 黄辉涛. 分光光度法测定尿中硫氰酸盐的异烟酸-吡唑酮[J]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 501, 504.
- [8] 武和平, 武景福. 尿中硫氰酸盐的气相色谱测定方法[J]. 职业与健康, 2005, 21(1): 40-41.
- [9] 钟良康, 方波. 超短柱顶空气相色谱法测定尿中硫氰酸盐[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(5): 568, 628.
- [10] 邵国健, 郭和光, 余娟. 离子色谱法测定尿中硫氰酸盐含量研究[J]. 浙江预防医学, 2011, 23(4): 95-96.
- [11] 李静, 王雨, 梁丽娜, 等. 混合模式色谱柱离子色谱法同时测定奶粉中的碘离子和硫氰酸根[J]. 色谱, 2010, 28(4): 422-425.
- [12] 王苏华, 陆荣柱, 邢光伟, 等. 镇江市健康人群尿硫氰酸盐参考值调查[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2007, 17(5): 448-450.
- [13] 钱小莲, 宋海燕, 柏建岭. 某食品企业149健康工人尿中硫氰酸盐水平分析[J]. 职业与健康, 2012, 30(8): 595-596.
- [14] 周元陵, 金复生, 朱瑞娟, 等. 尿硫氰酸盐正常参考值及其在丙烯腈作业工人健康监护中的应用[J]. 工业卫生与职业病, 2005, 31(4): 232-236.

(收稿日期: 2014-09-05)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 汪源)

【EHP 专栏】

二氯甲烷对人类健康的影响: 主要研究发现和科学问题

Paul M. Schlosser, Ambuja S. Bale, Catherine F. Gibbons, Amina Wilkins, Glinda S. Cooper

摘要: [背景] 美国EPA的综合风险信息系统(IRIS)在2011年11月完成了对二氯甲烷毒理学综述的更新。[目的] 本述评总结了这一综述中的主要结果和关键问题, 包括暴露来源、识别潜在的健康影响和更新的基于生理学的药代动力学(PBPK)建模方法。[方法] 对基础研究进行全面回顾, 并对PBPK模型进行评价。[讨论] 在若干经口和吸入暴露的动物研究中发现了肝脏毒性; 神经系统的影响也是需要关注的潜在研究领域。二氯甲烷被列为可能对人类具有致癌性, 其主要的证据基础是在雄性和雌性B6C3F1小鼠(吸入暴露)的两个部位(肝和肺)和雄性B6C3F1小鼠(饮用水暴露)的一个部位具有致癌作用。最近有关二氯甲烷的流行病学研究(2000年以来发表的7篇造血系统癌症研究)提供了更多的数据, 增加了人们对其与非霍奇金淋巴瘤和多发性骨髓瘤之间关联的关注。虽然数据库中仍存在诸多信息缺口, 比如二氯甲烷基因毒性(即体内靶组织中的DNA加合物的形成和基因突变), DNA损伤测定的阳性结果与组织和/或物种谷胱甘肽-S-转移酶(GST)代谢活性的获得能力之间的关联, 以及二氯甲烷诱发癌症的关键激活途径。IRIS评估中的创新之处在于专门针对推测的敏感基因型(GST-theta-1+/+)估计癌症风险, 以及在PBPK建模中考虑生理学分布, 该分布基于6个月至80岁所有个体的期望分布。[结论] 2011年IRIS的二氯甲烷评估提供了对这一常用溶剂毒性的新认识。

原文详见: *Environmental Health Perspectives*, 123(2): 114-119.