

## 基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.001

## 气相色谱-质谱法测定硫化氢中毒血液中的硫化物

罗才会<sup>1</sup>, 李剑波<sup>2</sup>, 于天晓<sup>1</sup>, 刘德伟<sup>2</sup>, 丁世家<sup>1</sup>

(重庆医科大学 1. 检验医学院、临床检验诊断学教育部重点实验室; 2. 基础医学院法医教研室, 重庆 400016)

**【摘要】**目的: 建立气相色谱-质谱(Gas chromatograph-mass spectrometry, GC/MS)法检测硫化氢中毒血液中硫化物的方法并用于实际检案分析。方法: 血样本中加入苯扎氯铵与四硼酸钠混合溶液, 在碱性条件下中毒血液中多种形态的硫化物转化成硫离子, 用五氟溴苄(Pentafluorobenzyl bromide, PFBBr)衍生化, 1,3,5-三溴苯(1,3,5-tribromobenzene, TBB)作为内标, 通过液-液萃取法提取衍生物五氟苄基硫醚(Bis-pentafluoro-benzyl-disulfide, BPFBD), 采用 GC/MS 仪检测, 选择离子检测扫描(Selected ion monitoring, SIM)模式, 内标法定量分析。结果: 在硫化钠浓度为 0.05~10.0  $\mu\text{mol/ml}$  范围的血样本中检测信号与硫化钠浓度有良好线性关系, 相关系数为 0.997 2, 最低检出限为 0.007 2  $\mu\text{mol/ml}$ 。结论: 本文建立的方法灵敏度高, 特异性好, 简便省时, 分析结果准确可靠, 适用于法医鉴定和临床检验血液中硫化氢的快速分析。

**【关键词】**硫化氢中毒血样本; 液-液萃取; 气相色谱-质谱法; 衍生化

**【中国图书分类法分类号】**R595.1; R446.11

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2012-07-04

## Determination of sulfide in the hydrogen sulfide poisoned blood using gas chromatography-mass spectrometry

LUO Caihui<sup>1</sup>, LI Jianbo<sup>2</sup>, YU Tianxiao<sup>1</sup>, LIU Dewei<sup>2</sup>, DING Shijia<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics Founded by Ministry of Education; 2. Department of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To establish a method for determining sulfide in the hydrogen sulfide poisoned blood using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) and to apply this method in reality. **Methods:** Different types of sulfides in poisoned blood were converted into sulfur ions by benzalkonium chloride and disodium tetraborate decahydrate mixed solution in alkaline medium. The target analytes were reacted with pentafluorobenzyl bromide (PFBBr) for derivatization. 1,3,5-tribromobenzene (TBB) was used as internal standard. The derivatives of sulfides were extracted by liquid-liquid solvent extraction and were analyzed by GC/MS. Data were acquired in the selected ion monitoring (SIM) mode and the quantitation of sulfide was done by using internal standard method. **Results:** A good linearity was obtained at the concentration range of 0.05–10.0  $\mu\text{mol/ml}$  in blood sample, with the correlation coefficient of 0.997 2. The lowest limit of detection was 0.007 2  $\mu\text{mol/ml}$ . **Conclusions:** The established method is proved to be sensitive, simple, specific and accurate. It can be applied in the quick detection of sulfides in the hydrogen sulfide poisoned blood in medicolegal identification and clinical laboratory.

**【Key words】**hydrogen sulfide poisoned blood; liquid-liquid extraction; gas chromatography-mass spectrometry; derivatization

硫化氢是一种比空气重, 且有窒息性和刺激性的无色气体, 有臭鸡蛋味, 能溶于水<sup>[1-3]</sup>, 在许多工业生产中都会产生硫化氢, 其中大约有 70 多种职业有机会接触硫化氢<sup>[4-6]</sup>。同时硫化氢也是一种神经毒剂, 当人们误吸入较大量的硫化氢时会造成硫化氢中

毒。硫化氢中毒主要是通过呼吸道吸入较大量的硫化氢气体, 引起细胞内窒息, 导致以中枢神经系统、呼吸系统为主要靶器官的多器官损害的全身性疾病<sup>[7]</sup>, 其中毒的程度与硫化氢的接触时间和浓度不同而异, 浓度越高则中枢神经抑制作用越明显, 浓度相对越低黏膜刺激作用明显<sup>[1]</sup>, 并且长时接触较小的硫化氢气体还会有致畸作用, 是职业性肿瘤的重要诱发因素之一<sup>[8]</sup>。因此建立一种简便、可靠的硫化氢中毒检测方法对法医学鉴定和临床诊断治

作者简介: 罗才会 (1986-), 女, 硕士,

研究方向: 生物分析化学。

通信作者: 丁世家, 男, 教授, Email: dingshijia@163.com。

基金项目: 司法部司法鉴定技术规范研制项目。

疗有着重要的意义。

急性硫化氢中毒后在血液中形成多种形态的硫化物,对血液中硫化物的检测常见的有分光光度法<sup>[9]</sup>,但其检测灵敏度较低且干扰较大,使其在法医鉴定中低浓度的阳性样本难以检测出。本文通过建立一种衍生化后用气相色谱-质谱(Gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS)仪进行快速分析的方法,大大提高了检测的灵敏度,并用于实际样本的检测,取得较好的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

Agilent 7890A/5975C GC/MS 仪(美国 Agilent 公司),配有电子轰击离子源及化学工作站。

五氟溴苄(Pentafluorobenzyl bromide, PFBBR), 十二烷基二甲基苄基氯化铵(苯扎氯铵)(Sigma-Aldrich 公司, 美国); 1,3,5-三溴苯(1,3,5-tribromobenzene, TBB)购自于上海一基实业有限公司;硫化钠、四硼酸钠、磷酸二氢钾、乙酸乙酯、甲苯购自于天津四友精细化学试剂有限公司;以上试剂均为分析纯以上级别。实验用水为去离子水(电阻率大于 18 MΩ)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 称取硫化钠溶于去离子水中,配成 20.0 μmol/ml 的储备液,于 -20 °C 冰箱冷冻保存。根据需要将储备液稀释后添加于空白血液中,配制成不同浓度的标准工作液;称取苯扎氯铵(5.0 μmol/ml)溶于四硼酸钠缓冲液(0.04 mol/L)中,配成 1.5 ml 的混合溶液;称取 PFBBR(衍生化试剂, 20.0 μmol/ml)溶于 1 ml 的甲苯溶液中;将 TBB(内标, 10.0 μmol/L)溶于 1 ml 的乙酸乙酯中。

1.2.2 萃取步骤 在 10.0 ml 具螺旋盖的玻璃离心管中加入不同浓度的标准工作液 0.4 ml,加入 1.5 ml, 5 μmol/ml 苯扎氯铵的 0.04 mol/L 四硼酸钠缓冲溶液,然后加入 20.0 μmol/ml PFBBR 甲苯溶液 1.0 ml、10.0 μmol/L TBB 乙酸乙酯溶液(内标)1.0 ml,加盖密封,于振荡器中振荡 1 min,置于 55 °C 恒温摇床中振荡 4 h,加入 0.1 g 的磷酸二氢钾,振荡器中振荡 1 min,于转速为 4 000 r/min 离心机上离心 5 min(0 °C),分离有机层,取样 1.0 μl 进行 GC/MS 分析。

1.2.3 测定方法 PFBBR 与样品中的 S<sup>2-</sup>发生衍生化反应,生成衍生物五氟苄基硫醚(Bis-pentafluorobenzyl-disulfide, BPFBD),产物如图 1 所示。通过气相色谱分离、质谱定性后,用反应产物的选择离子质荷比(m/z)181(基峰)与内标物 TBB 的选择离子 m/z 312 的峰面积比定量分析。

1.2.4 色谱条件 色谱柱(HP-5MS 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);进样口温度 200 °C;传输线温度 240 °C;色谱柱程序升温:初始温度 50 °C,保持 1 min,以 10 °C/min 升到 280 °C,保持 1 min;载气为氦气,流速 1.0 ml/min;分流比 10:1,进样量 1.0 μl。

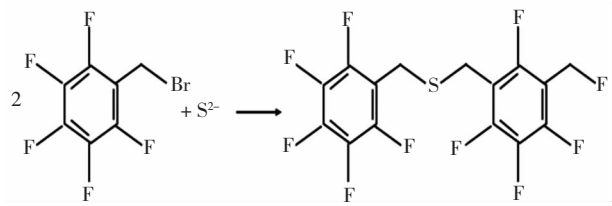


图 1 PFBBR 与中毒血液中硫离子的反应

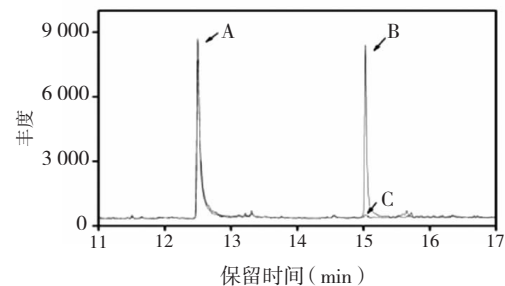
Fig.1 Reaction of PFBBR to sulfur ions in the poisoned blood

1.2.5 质谱条件 电子轰击离子源,电子能量 70 eV,离子源温度:250 °C,质子扫描范围 0~400 amu;扫描方式:选择离子检测扫描(Selected ion monitoring, SIM);定量离子: BPFBD m/z 181, TBB m/z 312。

## 2 结果

### 2.1 色谱分离

分别取空白血和在空白血中添加硫化钠,用上述方法处理后,采用 SIM 扫描检测,硫化氢衍生物的保留时间为 15.0 min,内标物的保留时间为 12.5 min,它们与其它杂质峰均得到了完全的分离,见图 2。



A. TBB(内标); B. 血中添加的硫化氢; C. 空白血样

图 2 硫化氢衍生物的色谱图

Fig.2 Chromatogram for hydrogen sulfide derivative

### 2.2 质谱定性

图 3 为硫化氢衍生物的质谱图,特征离子为 m/z 394、181、45,定量选择离子 m/z 181 是 2 个苄基离子。内标 TBB 的定量选择离子为 m/z 312,此外 m/z 233、154 可作为特征离子峰。

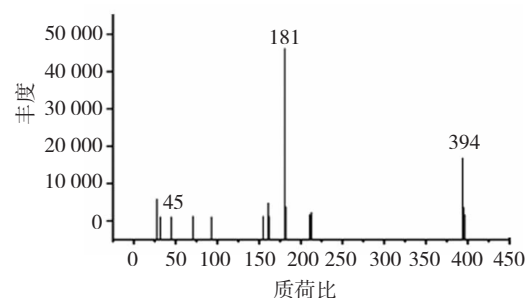


图 3 硫化氢衍生物的质谱图

Fig.3 Mass spectrogram for hydrogen sulfide derivative

### 2.3 实验条件的优化

液-液萃取的温度和时间严重影响着实验结果,因此我们对液-液萃取的温度和时间进行了优化。通过实验可得出在 55 °C 和 4 h 时,实验检测结果为最优的,因此选择 55 °C 和 4 h 为最优的萃取温度和时间。

### 2.4 校准曲线及检测限

将不同体积 20.0 μmol/ml 的硫化钠储备液添加到空白血液中,配制成浓度为 0.05、0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 μmol/ml 的硫化钠标准系列工作溶液,按上述液-液萃取法进行样品预处理,取 1.0 μl 样品进行 GC/MS 分析。记录不同浓度硫化钠衍生物 BPFBD 与内标 TBB 的保留时间及质谱特征离子峰以及其对应的峰面积,由于峰面积之比( $A_{BPFBD}/A_{TBB}$ )与硫化钠浓度关系符合以下公式, $A_{BPFBD}/A_{TBB}=KC$ (K 为常数,C 为硫化钠浓度),以 BPFBD 与内标物选择离子峰面积之比( $A_{BPFBD}/A_{TBB}$ )为纵坐标(Y),硫化钠浓度为横坐标(X)作图得出标准曲线,见图 4,硫化钠在 0.05~10.0 μmol/ml 范围表现出良好的线性关系,其线性方程为  $Y=0.1764X+0.5823$ ,相关系数 R 为 0.9972。根据信噪比(S/N=3),计算出其最低检出限为 0.0072 μmol/ml。

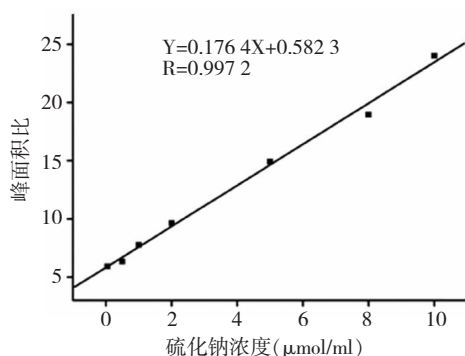


图 4 血液中硫化氢衍生物的标准曲线

Fig.4 Calibration curve of hydrogen sulfide derivative in the blood

### 2.5 精密度和添加回收率

硫化钠浓度为 1.0 μmol/ml 的血样本添加 4.0 μmol/ml 的硫化钠,硫化钠浓度为 5.0 μmol/ml 的血样本添加 5.0 μmol/ml 的硫化钠,进行精密度和添加回收率实验,每个添加浓度平行 3 次,按上述方法处理,通过 GC/MS 分析,计算其精密度和回收率,结果如表 1。

表 1 血液中硫化钠的精密度和添加回收率的测定结果

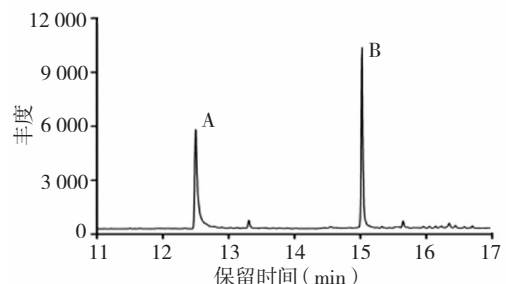
Tab.1 Precision and spiked recoveries of sodium sulfide in the blood

添加硫化钠浓度 (μmol/ml)	精密度 (%)	回收率 (%)
4	4.0	106
5	1.4	108

### 2.6 实际检案分析

2011 年 7 月重庆市某沼泽地的 3 名工作人员在工作中死亡,取全血做毒物分析,按照本文建立的实验方法测定,3

名工作人员血液的检测结果分别为 47.678 3、14.385 5、0.096 μmol/ml,而正常人血中硫化氢浓度小于 0.003 μmol/ml<sup>[10]</sup>,结果表明以上 3 名工作人员是硫化氢中毒而引起的死亡,图 5 为一中毒样本 GC/MS 分析 SIM 扫描检测的色谱图。



A. TBB (内标); B. 血中的硫化氢

图 5 实际硫化氢中毒血液样本的色谱图

Fig.5 Chromatogram for hydrogen sulfide poisoned blood sample in reality

## 3 讨论

硫化氢中毒在日常工作和生活中严重影响着人们的健康,在产业中毒和法医中毒中日益引起人们的关注。当发生硫化氢中毒案件后,有的通过环保部门对大气的检测推断,有的根据中毒症状推断,也有根据原始材料的性质推断,但是这些都没有一个可靠统一的判断标准,因此确定是否为硫化氢中毒是个难题。目前检测硫化氢中毒生物检材的方法主要是分光光度法,但其灵敏度较低且无法满足法医鉴定的要求,本文成功建立了液-液萃取和 GC/MS 分析硫化氢中毒血液中硫化物的方法,该方法样本用量少且便于采集,预处理简单,检测时间短,有较好的线性关系和高灵敏等优点,为法医鉴定硫化氢中毒提供了一实用性技术,对法医鉴定和临床检验硫化氢中毒血中硫化氢的定性定量分析具有重要的意义。

## 参 考 文 献

- [1] 陈 明,赵向阳.硫化氢气体检测方法及安全防范措施[J].油气田环境保护,2011,21(1):44-46.  
Chen M,Zhao X Y.Detection methods and protection measures of H<sub>2</sub>S gas[J].Environmental Protection of Oil & Gas Fields,2011,21(1):44-46.
- [2] Maebashi K,Iwadate K,Sakai K,et al.Toxicological analysis of 17 autopsy cases of hydrogen sulfide poisoning resulting from the inhalation of intentionally generated hydrogen sulfide gas[J].Forensic Science International,2011,207:91-95.

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.002

# IgA 肾病骨桥蛋白、CD68 的表达及其与肾间质损伤的关系

杨洪梅, 钟 清

(重庆医科大学附属第一医院肾内科, 重庆 400016)

**【摘要】**目的:探讨 IgA 肾病骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)、CD68 的表达及其与肾间质损伤的关系。方法:根据肾活检结果选取 26 例已经确诊的原发性 IgA 肾病的肾组织作为实验组。按 Lee 氏法将肾组织病理损害分为 I~V 级并将肾间质损伤分为 0~3 级。另取 4 例因肾外伤或肾肿瘤切除的患肾中的正常肾组织作为对照组。免疫组化法检测肾组织中 OPN、CD68 的表达, RT-PCR 技术检测肾组织 OPN mRNA 的表达。结果:(1)IgA 肾病中有高达 86% 的患者伴有不同程度肾间质损伤。实验组肾间质中 CD68 的表达较对照组显著增高, 差异有统计学意义。(2)实验组 OPN、OPN mRNA 的表达均较正常组显著升高( $P<0.05$ )。OPN、OPN mRNA 的表达与肾间质损伤程度无相关性。肾间质内 CD68 的表达与肾间质损害成正相关。OPN 的表达与肾间质内 CD68 的表达呈正相关( $r_s=0.545, P=0.044$ )。结论:单核/巨噬细胞的浸润参与了 IgA 肾病肾间质的损伤。骨桥蛋白与炎症有关, 它通过介导单核巨噬细胞的浸润参与 IgA 肾病肾间质的损伤。

**【关键词】**IgA 肾病; 骨桥蛋白; 肾间质损伤

**【中国图书分类法分类号】**R692

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2011-10-17

## Expressions of osteopontin and CD68 and their relationship with renal interstitial injury in IgA nephropathy

YANG Hongmei, ZHONG Qing

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To investigate the expressions of osteopontin(OPN) and CD68 in IgA nephropathy and their relationship with renal interstitial injury. **Methods:** According to biopsy results, renal biopsy specimens from 26 patients with diagnosed primary IgA

**作者简介:**杨洪梅(1984-),女,住院医师,硕士,研究方向:肾脏免疫。

**通信作者:**钟 清,女,副教授,Email:zqdm2009@163.com。

**基金项目:**重庆市卫生局立项课题资助项目(编号:2008-2-69)。

[3] Tai L, Zhou Y X. Study of determining the concentration of hydrogen sulfide in air by methylene blue spectrophotometric method[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 110(116): 3086-3091.

[4] 温维丽, 董焕萍, 周晓东, 等. 硫化氢浓度测定方法的比较和建议[J]. 中国个体防护装备, 2010, (1): 42-44.

Wen W L, Dong H P, Zhou X D, et al. Comparison and suggestion of method for the titer of hydrogen sulfide[J]. China Personal Protective Equipment, 2010, (1): 42-44.

[5] Shirsat M D, Bangar M A, Deshusses M A, et al. Polyamine nanowires-gold nanoparticles hybrid network based chemiresistive hydrogen sulfide sensor[J]. American Institute of Physics, 2009, 94(8): 0835021-0835023.

[6] 唐 丰. 硫化氢危害的安全防范与应急措施[J]. 安全与健康, 2008, (2): 44-45.

Tang F. Safety precautions and emergency measures for hydrogen sulfide hazard[J]. Safety & Health, 2008, (2): 44-45.

[7] 韩志英, 金复生. 硫化氢中毒研究进展[J]. 工业卫生与职业病,

2006, 32(2): 118-121.

Han Z Y, Jin F S. Research progress of hydrogen sulfide poisoning[J]. Industrial Health & Occupational Diseases, 2006, 32(2): 118-121.

[8] 高天荣, 刘剑虹, 李卫军. 橡胶炼胶烟气及硫化烟气中含硫化化合物的 GC/MS 分析[J]. 质谱学报, 1995, 16(2): 77-79.

Gao T R, Liu J H, Li W J. GC/MS analysis of sulphide in the smoke of processing and vulcanizing rubber[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 1995, 16(2): 77-79.

[9] 褚建新, 满 勤, 包朝胜, 等. 分光光度法检测硫化氢中毒血液中的硫化血红蛋白[J]. 法医学杂志, 2003, 19(4): 212-214.

Chu J X, Man Q, Bao C S, et al. Determination of hemoglobin in poisoned blood by spectrophotometry[J]. Journal of Forensic Medicine, 2003, 19(4): 212-214.

[10] Ago M, Ago K, Ogata M. Two fatalities by hydrogen sulfide poisoning: variation of pathological and toxicological findings[J]. Leg Med (Tokyo), 2008, 10(3): 148-152.

(责任编辑: 关蕴良)