doi:10.3969/j.issn.2095-1035.2013.01.020

离子色谱法检验血液中的亚硝酸盐

王 勇[1] 左跃先[1] 宋胜利[2] 霍宗利[3] 柴锦峰[4]

(1 南京市公安局 刑事科学技术研究所,江苏 南京 210001;2 重庆市公安局 物证鉴定中心,重庆 400021;
3 江苏省疾病预防控制中心,江苏 南京 210009;4 山西省河津市刑警大队,山西 运城 043300)

摘 要 建立了使用离子色谱检验血液中亚硝酸盐含量的方法。血液样品经乙腈沉淀蛋白,过 Dionex OnGuard Ⅱ RP,Ag/Na 前处理柱后,经 IonPac AS-19 阴离子色谱柱分离,用 KOH 淋洗液自动发生器(EG)进行梯度淋洗,抑制器采用外加水模式,电导检测器检测。NO_2^- 标准溶液的浓度在 0.214～21.4 mg/L时线性关系良好,线性方程为 $Y=0.020\ 9X+0.518\ 9$,相关系数 $r^2=0.999\ 9$,血中 NO_2^- 的检出限为 0.39 μg/L,回收率为 96.5%～101.2%。检验方法快捷,操作简便,回收率高,重现性好,可满足案件需要。

关键词 离子色谱法;亚硝酸盐;全血;电导检测

中图分类号:O657.7+5;TH833 **文献标志码**:A **文章编号**:2095-1035(2013)01-0080-03

Determination of Nitrite in Blood by Ion Chromatography

WANG Yong[1], ZUO Yuexian[1], SONG Shengli[2], HUO Zongli[3], CHAI Jinfeng[4]

(1. *Institute of Forensic Science and Technology of Nanjing Public Security Bureau, Nanjing* 210001, *China*;
2. *Institute of Forensic Science Ministry of Chongqing Public Security Bureau, Chongqing* 400021, *China*;
3. *Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing* 210009, *China*;
4. *Criminal Police Group of Hejin County Public Security Bureau, Yuncheng Shanxi* 043300, *China*)

Abstract A method for the determination of nitrite in blood by ion chromatography was established. The protein in blood was precipitated with acetonitrile and then the large molecules and Cl^- in the supernatant were removed by using a Dionex OnGuard Ⅱ RP column and a Dionex OnGuard Ⅱ Ag/Na column. The filtrate went through gradient elution with KOH solution produced by an online eluent generator(EG). The suppressor took the external water mode and a conductivity detector was used. When the concentration of NO_2^- standard solution are in the range of 0.214～21.4 mg/L, the concentration has a good linear relationship with detection signal and the linear equation is $Y=0.020\ 9X+0.518\ 9$ with $r^2=0.999\ 9$. The limit of detection (LOD, S/N=3) of nitrite in blood was 0.39 μg/L. The average recoveries were between 96.5% to 101.2%. Because of fast testing, easy instrumental operation, high recovery, good repeatability, this method can meet the needs for public security work.

Keywords ion chromatography; nitrite; blood; conductivity detection

0 前言

亚硝酸盐(Nitrite)是一种血液毒,进入体内后,亚硝酸根离子(NO_2^-)能迅速将血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,失去携氧功能而引起严重缺氧,造成机体窒息死亡,口服亚硝酸盐 0.3～0.5 g 可中毒,3 g

收稿日期:2012-07-02 **修回日期**:2012-07-18

作者简介:王勇,助理工程师,主要从事毒物、毒品鉴定及微量物证检验方面的工作。E-mail:wyong812@yahoo.com.cn

可致死。在常态下,亚硝酸盐通常呈白色或浅黄色粒状结晶,形似食盐,因此常因误食而中毒。另外,因其广泛用作化工原料及分析试剂等,较为常见、易得,利用亚硝酸盐投毒而致人死伤的案件也时有发生。因此,建立血液中亚硝酸盐含量的检测方法对此类案件的定性及侦破具有比较重要的意义[1]。

对于亚硝酸盐的检验,通常有化学法、分光光度法、极谱法、离子色谱法等,其中化学法是通过亚硝酸盐与特定试剂反应所产生的颜色变化来进行定性检验,定量精度较差[2]。与其他仪器法相比,离子色谱法在亚硝酸盐检测的精密度、准确度方面具有较大的优势,尤其是淋洗液自动发生器(EG)的运用[3-4],使得仅使用去离子水即可在线实时生成所需浓度的淋洗液,避免了因手工配制淋洗液所造成的误差,在简化检验程序的同时,提高了检测结果的重现性,同时降低了对环境的污染[5-8]。目前在国内报道的文献中,仅见血清中亚硝酸盐的检验[9],而对于全血中亚硝酸盐的检验则未见报道。在法医鉴定工作中,由于人体死亡后血液中的红细胞壁会发生破裂而产生溶血,导致无法从血液中分离出血清,因此对于法医鉴定专业来说,建立全血中亚硝酸根离子的检测方法具有更加实际的意义。研究表明,运用离子色谱法检测血液中的亚硝酸盐,可以灵活调节淋洗液的梯度程序,保证亚硝酸盐和其他干扰离子实现良好分离,检测结果具有良好的重现性,检验过程简便快捷,满足血液中亚硝酸盐的检测需要。

1　实验部分

1.1　主要仪器与试剂

ICS-3000 型离子色谱仪(配备 KOH 淋洗液自动发生器、AS 自动进样器,美国 ThermoFisher 公司),entrifuge 5430 型高速离心机(德国艾本德公司),SK-1 型快速混匀器(金坛市顺华仪器有限公司),Millipore Direct Q-5 超纯水仪(美国密理博公司)。

Dionex OnGuard Ⅱ 过滤柱(RP 柱,Ag 柱,Na 柱,美国 ThermoFisher 公司),15 mL 高速离心管(美国 BD 公司),一次性 1 mL 注射器(常州金龙医用塑料器械有限公司),有机相性针式滤器(13 mm×0.22 μm,上海安谱科学仪器有限公司)等耗材。

乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),NO_2^- 标准品(水剂,以 N 计 100 mg/L,国家标准物质研究中心),实验用水为超纯水。

1.2　色谱条件

色谱柱使用 Dionex IonPac AS-19 阴离子分析柱(4 mm × 250 mm)及 IonPac AG-19 保护柱(4 mm×50 mm);ASRS 300 阴离子抑制器,抑制电流为 112 mA;外加水模式,电导检测器;自动进样,定量环 25 μL,流速 1 mL/min,柱温 30 ℃,检测池温度 35 ℃,梯度淋洗。淋洗程序见表 1[10]。

表 1　KOH 淋洗液的梯度程序

Table 1　The program for the KOH gradient elution

时间/min	KOH 浓度/(mmol·L^{-1})
0～5	10
5～15	10～45
15～20	45
20.1～23	10

1.3　标准溶液的配制

使用 100 mg/L 的 NO-2-N 标准样品,换算成以 NO_2^- 计,并用去离子水进行稀释,得到 21.4,4.28,2.14,0.214 mg/L 的 NO_2^- 系列标准溶液。

1.4　样品前处理

将 Dionex OnGuard Ⅱ Ag 柱和 Na 柱分别用 10 mL 去离子水活化,Dionex OnGuard Ⅱ RP 柱分别用 5 mL 甲醇、10 mL 去离子水活化,流速均为 2 mL/min,活化时间均为 30 min。

用移液枪准确移取 1 mL 尸体心血,置于 15 mL 塑料离心管中,加入 2 mL 乙腈沉淀蛋白,加入去离子水 7 mL,振荡、混匀,5 min 后置于高速离心机以 7 800 r/min 的转速离心 10 min,取上清液分别过经活化的 Dionex OnGuard Ⅱ RP 柱、Dionex OnGuard Ⅱ Ag/Na 柱及有机相性针式滤器,弃去前面3 mL 流出液后开始收集滤液。

2　结果与讨论

2.1　沉淀蛋白质方法的选择

对于蛋白质沉淀方法的选择,根据离子色谱的特点,比较了乙腈、丙酮、乙醇、甲醇等有机溶剂作为沉淀剂。乙腈的介电常数较小,沉淀蛋白质的效率相对较高,2 mL 乙腈可沉淀 1 mL 血中 95%以上的蛋白质,并且对样品本身的 pH 值干扰较小,因此选用 2 倍血体积的乙腈作为蛋白质沉淀剂。

2.2　梯度程序的选择

血液中成分复杂,多种离子掺杂其中,对于此种复杂基质,需采用梯度淋洗分离 NO_2^- 离子。通过实验比较与筛选表明,采用表 1 的梯度程序可实现血样中 NO_2^- 与其他干扰组分的良好分离,分离谱图见图 1。

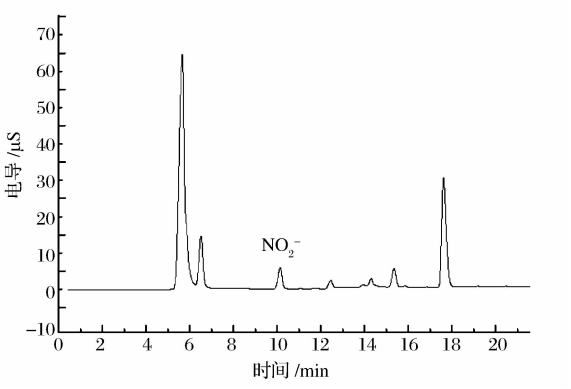


图 1 血样中 NO_2^- 谱图

Figure 1 A chromatogram of NO_2^- in a blood sample.

2.3 线性范围、检出限和定量限

在所选定的色谱条件下，测得 NO_2^- 标准溶液的质量浓度在 0.214～21.4 mg/L 时线性关系良好。使用浓度分别为 0.214，2.14，4.28，21.4 mg/L 的 NO_2^- 标准溶液进样分析，以 NO_2^- 的质量浓度(mg/L)为横坐标，测得的峰面积为纵坐标作图，得到 NO_2^- 线性方程为 $Y=0.0209X+0.5189$，相关系数 $r^2=0.9999$。采用标准添加法，以信噪比(S/N)为 3 确定血中 NO_2^- 的检出限为 0.39 μg/L，以信噪比(S/N)为 10 确定血中 NO_2^- 的定量限为 1.287 μg/L。

2.4 方法回收率和精密度

取 1 mL 空白血，分别使用 2.14，4.28，21.4 mg/L的 NO_2^- 标准溶液代替去离子水按照 1.4 节所述实验步骤进行处理，每个浓度平行提取、测定 6 次，得到平均回收率为 96.5%～101.2%，相对标准偏差为 1.2%～2.3%，所得结果见表 2。

表 2 人血中 NO_2^- 的加标回收率及精密度($n=6$)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of nitrite in human blood samples /%

成分	21.4 mg/L		4.28 mg/L		2.14 mg/L	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
NO_2^-	101.2	2.3	96.5	2.3	97.9	1.2

2.5 涉案尸体心血中 NO_2^- 含量的测定

2011 年 11 月，南京市禹某被发现在路边死亡。经法医检验，死者尸斑呈蓝褐色青紫，口唇、指甲显著青紫，眼结膜可见斑点状出血，呈显著缺氧症状。提取死者心血发现血液不凝固，呈流动性，高度怀疑死者系亚硝酸盐中毒致死。提取死者心血经本法重复检验 3 次，扣除稀释因素的影响，检出死者禹某心血中亚 NO_2^- 平均含量高达 50.4 mg/L。以此结论为依据，民警围绕亚硝酸盐展开调查，很快在死者驾驶的轿车内发现一瓶标有“亚硝酸钠”的晶体及一个饮水杯，在水杯液体中也检验出高浓度的 NO_2^-。民警同时在车内发现死者遗书 1 份，结合本检验结论，证实死者系服用亚硝酸盐自杀致死，使得案件迅速侦结，及时消除了社会影响。

3 结论

在实际工作中，亚硝酸盐中毒以群发性多见，要求法医鉴定人员能在短时间内对大量的样品进行处理、分析，及时给出结果。方法紧密围绕公安工作中对中毒类案件的实际需要，简化前处理程序，优化仪器条件，在短时间内即可提供准确无误的检验结论，适合大批量样品的检验，并已成功运用到了实发案例中。同时该法也可用作其他基质中的亚硝酸盐含量检测，如米糊、菜品等，均有实发案例的验证。该法具有所用试剂、耗材成本较低，前处理简单，定量结果可靠性高的优点，进样后分析过程可在 30 min 内完成，可迅速为案件的侦破提供可靠的线索和依据，满足公安工作的需要。

参考文献

[1] 刘良. 法医毒理学[M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社，2009：144-147.

[2] 陆惠民. 毒物分析[M]. 北京：警官教育出版社，2006：124-129.

[3] 赵春燕. 离子色谱法测定东下冯遗址土壤中的无机阴离子[J]. 中国无机分析化学，2012，2(3)：22-23，34.

[4] 殷月芬，于怡，郑立，等. 离子色谱法测定南海海水中的硝酸盐和磷酸盐及其对地球化学意义的初探[J]. 中国无机分析化学，2012，2(3)：15-17.

[5] 陈浩，徐娟，薛爱芳，等. 纤维素酶降解-离子色谱法测定魔芋中的亚硝酸盐[J]. 色谱，2007，25(4)：598-599.

[6] 姚敬，杭义萍，钟志雄，等. 在线渗析-离子色谱联用同时测定熟肉制品中的亚硝酸盐和硝酸盐[J]. 食品科学，2010，31(2)：187-190.

[7] 林红梅，林奇，张远辉，等. 在线样品前处理大体积进样离子色谱法直接测定海水中亚硝酸盐、硝酸盐和磷酸盐[J]. 色谱，2012，30(4)：374-377.

[8] 钟莺莺，陈平，俞雪钧，等. 改进的离子色谱法测定乳制品中亚硝酸盐和硝酸盐[J]. 色谱，2012，30(6)：635-640.

[9] 林玉娜，罗晓燕，刘莉志，等. 血清和尿中亚硝酸盐含量的离子色谱测定法[J]. 职业与健康，2011，27(4)：封二，封三.

[10] 王勇，吴波，连厚斌，等. 离子色谱法检验尸体心血中的草甘膦[J]. 色谱，2012，30(4)：419-422.