

# 唾液中氰离子的五氟苄基溴衍生 气相色谱法测定

庄小舟, 叶立和, 彭建梅, 蔡小璇, 周常侠, 钟苑琴

东莞市职业病防治中心理化检验科, 广东 东莞 523008

**摘要:** **目的** 建立用五氟苄基溴(PFB-Br)衍生气相色谱法, 电子捕获检测器(ECD)定量测定唾液中氰离子( $\text{CN}^-$ )的方法。**方法** 取微量唾液, 加入缓冲溶液后用乙腈稀释定容, 加入定量的 PFB-Br 摇匀, 沸水浴 30.0 min 进行衍生反应, 冷却后直接进样入气相色谱仪分离, 以 ECD 检测器检测。**结果** 唾液中  $\text{CN}^-$  的质量浓度在 0.25~200.0 mg/L 呈线性关系, 线性相关系数为 0.999 4; 以 100.0  $\mu\text{l}$  唾液量计算, 方法最低检出浓度为 0.07 mg/L, 最低定量浓度为 0.25 mg/L; 方法的批间精密密度为 2.4%~5.3% ( $n=6$ ), 批内精密密度为 1.1%~3.8% ( $n=6$ ), 加标回收率为 100.7%~102.1%。唾液常见的无机离子  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$  和  $\text{SCN}^-$  对测定结果均无干扰。样品可在 4  $^{\circ}\text{C}$  保存至少 15 d。**结论** 该方法适用于唾液中氰离子测定, 对氰化物中毒的应急检测有应用价值。

**关键词:** 唾液氰离子; 五氟苄基溴; 衍生化; 气相色谱法; ECD 检测

**中图分类号:** R446.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)08-0918-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.08.006

## Determination of cyanide ions in saliva using gas chromatography after derivatization with pentafluorobenzyl bromide

ZHUANG Xiao-zhou, YE Li-he, PENG Jian-mei, CAI Xiao-xuan, ZHOU Chang-xia, ZHONG Yuan-qin

Department of Physicochemical Laboratory, Dongguan Municipal Center for Occupational Disease Prevention and Treatment, Dongguan, Guangdong 523008, China

Corresponding author: YE Li-he, E-mail: 1303778528@qq.com

**Abstract:** **Objective** To establish an analytical method for quantitative determination of cyanide ion in saliva based on gas chromatography with electron capture detector (ECD) after derivatization with pentafluorobenzyl bromide (PFB-Br). **Methods**

A small amount of saliva was diluted to volume with acetonitrile solution after being added buffer solution, then was added quantitative PFB-Br and shaken well. The samples which had been boiled 30 minutes for the derivative reaction were injected into the gas chromatograph directly to be separated after cooling, and then detected by ECD. **Results** The method showed that a good linearity range of cyanide ion mass concentration in saliva was 0.25~200.0 mg/L, and the linear correlation coefficient was 0.999,4. The detection limit was 0.07 mg/L and the minimum detection concentration was 0.25 mg/L when saliva volume was 100.0  $\mu\text{l}$ . The between-run relative standard deviation (RSD) was in the range of 2.4%~5.3% ( $n=6$ ), the within-run RSD was in the range of 1.1%~3.8% ( $n=6$ ), and the recovery rate was between 100.7% and 102.1%. The common inorganic ions as  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$  and  $\text{SCN}^-$  in saliva had no interference to the determination results. The samples could be stored for at least 15 days in a refrigerator at 4  $^{\circ}\text{C}$ . **Conclusions** This method is applicable for determination of cyanide ions in saliva and valuable for emergency detection of cyanide poisoning.

**Key words:** cyanide ion in saliva; pentafluorobenzyl bromide; derivatization; gas chromatography; ECD detection

近年来,生活性氰化物中毒<sup>[1~2]</sup>和职业性氰化物中毒<sup>[3~4]</sup>在国内外多见报道。工作场所中氰化物的管控<sup>[5]</sup>以及水源氰化物的健康风险研究<sup>[6]</sup>也逐渐引起关注。急性氰化物中毒事故调查首选的检材为空气样

品、可疑食物和饮水、病人呕吐物及死者胃内容物<sup>[7]</sup>。在实际调查中,往往很难发现可疑的食源性毒物<sup>[8]</sup>; 呕吐物和胃内容物的取材过程比较困难<sup>[9]</sup>,样品基质复杂,前处理操作繁琐<sup>[10]</sup>。本研究选择唾液为检材<sup>[11]</sup>,乙腈为溶剂,在 pH=7.0 缓冲溶液存在的条件下以 PFB-Br 为衍生剂,经沸水浴 30 min 后冷却直接进样气相色谱仪的 ECD 检测器检测,现报告如下。

**基金项目:** 东莞市社会科技发展项目(201750715005125)

**作者简介:** 庄小舟(1986-),男,广东汕头人,硕士,主管技师,研究方向:理化检验技术。

**通信作者:** 叶立和, E-mail: 1303778528@qq.com。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 ①仪器和器材:7890B 型气相色谱仪(美国 Agilent 公司),带电子捕获检测器(ECD)、DB-17 色谱柱(30.00 m×0.32 mm×0.25 μm);PWC 214 型分析天平(英国 ADAM 公司);远红外快速干燥箱(上海跃进医疗器械有限公司)。②试剂:水中氰离子标准溶液(50.0 μg/ml,中国计量科学研究院);乙腈(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);磷酸二氢钾(分析纯,广州化学试剂厂);磷酸氢二钠(分析纯,广州化学试剂厂);2,3,4,5,6-五氟苄基溴(fluorobenzyl bromide, PFB-Br)(上海安谱实验科技股份有限公司);磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0):溶解 2.790 1 g 磷酸二氢钾和 4.140 5 g 磷酸氢二钠于少量蒸馏水中,并定容至 1 L;PFB-Br 衍生剂配制:称取 3.300 2 g 的 PFB-Br,用少量乙腈溶解后,用乙腈定容于 50.0 ml 容量瓶中配制而成,置于棕色试剂瓶中避光保存。

1.2 样品采集和保存 用具塞聚乙烯塑料瓶采集唾液 0.5~1.0 ml,避光于 4 ℃ 保存待测,在此条件下样品在可保存至少 15 d。

1.3 色谱条件 DB-17 色谱柱;升温程序:初温为 60 ℃,保持 0.5 min,以 20 ℃/min 升至 200 ℃,保持 2.5 min;气化室温度:250 ℃;ECD 温度:300 ℃,尾吹气为氮气,流量 60.00 ml/min;分流比为 10:1;载气(氮气)流量:恒流 1.00 ml/min;进样量:1.0 μl。

1.4 分析步骤

1.4.1 标准系列配制 临用前用蒸馏水将水中氰标准溶液稀释至 10.0 μg/ml 的氰离子标准溶液;取 7 个样品瓶各加入缓冲溶液 100.0 μl,依次加入 0.0、20.0、40.0、70.0、100.0、150.0、200.0 μl 的氰离子标准溶液(10.00 μg/ml),用乙腈溶液定容至 1.0 ml,配成 0.00、0.20、0.40、0.70、1.00、1.50、2.00 μg/ml 的 CN<sup>-</sup> 标准系列。

1.4.2 样品衍生处理 取 100.0 μl 待测唾液样品加入缓冲溶液 100.0 μl,加乙腈溶液 900.0 μl 定容至 1.0 ml 样品瓶,摇匀。加入 80.0 μl 的 PFB-Br 衍生剂,盖紧瓶盖置于沸水浴加热 30.0 min,以同样方法对标准系列进行衍生处理,冷却至室温,待测定。

1.4.3 样品测定 以 1.0 μl 的进样量,将标准系列、空白样品溶液和样品溶液直接进气相色谱仪,通过 ECD 检测器检测峰面积,外标法定量。

2 结果

2.1 氰离子衍生物色谱分离图 唾液中的氰离子衍生物的保留时间为 83~87 min,气相色谱分离图见图 1。

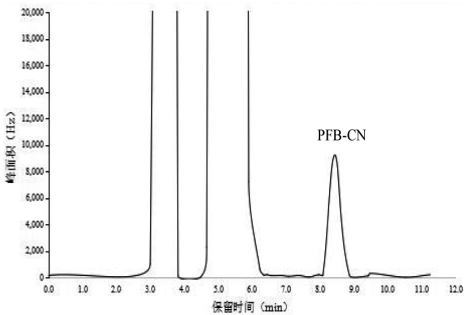


图 1 唾液中氰离子衍生物 PFB-CN 色谱图

2.2 衍生条件的影响

2.2.1 缓冲溶液的影响 取 8 个样品瓶,分 2 组每组各 4 个样品,每组均加入 100.0 μl 唾液,依次加入 20.0、60.0、150.0、200.0 μl 的氰离子标准溶液(10.00 μg/ml)用乙腈配制成 0.20、0.60、1.50、2.00 μg/ml 的样品;第 1 组不加入缓冲溶液,第 2 组加入 100.0 μl 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0),两组均加入 80.0 μl 的 PFB-Br 衍生剂,盖紧瓶盖置于沸水浴加热 30.0 min,衍生后平行测定 6 次取均值,结果见表 1。结果显示:不加缓冲溶液的第 1 组样品浓度与测定值不呈线性相关,加入磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0)的第 2 组样品结果呈线性相关。

表 1 缓冲溶液对衍生结果的影响(平行测定 6 次)

分组	浓度(μg/ml)			
	0.20	0.60	1.50	2.00
第 1 组峰面积(Hz)	9.8×10 <sup>3</sup>	8.9×10 <sup>3</sup>	9.1×10 <sup>3</sup>	9.7×10 <sup>3</sup>
第 2 组峰面积(Hz)	9.6×10 <sup>3</sup>	3.4×10 <sup>4</sup>	9.4×10 <sup>4</sup>	1.3×10 <sup>5</sup>

注:第 1 组样品不加入缓冲溶液,第 2 组样品加入 100.0 μl 磷酸盐缓冲溶液(pH=7.0)。

2.2.2 加热时间的影响 取 11 个样品瓶加入缓冲溶液后,加入 CN<sup>-</sup>用乙腈配制成 1.00 μg/ml 的平行样品,各加入 PFB-Br 衍生剂 80.0 μl,摇匀;除第一个不加热以外,在沸水浴条件下,分别加热 10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、100.0、120.0 min 后测定,平行测定 6 次,见图 2。结果显示:当加热时间为 30.0 min 时,测定结果趋于稳定,且达到最高值。

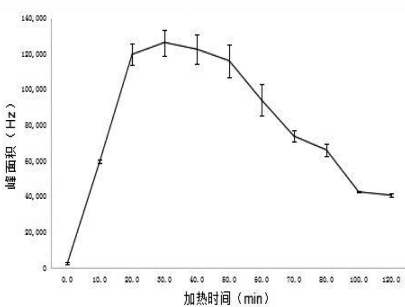


图 2 加热时间对衍生结果的影响(平行测定 6 次)

2.2.3 衍生剂用量的影响 取 9 个样品瓶加入缓冲

溶液后,配制  $\text{CN}^-$  加标量为 1.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的平行样品,各加入 PFB-Br 衍生剂 10.0、20.0、40.0、50.0、60.0、80.0、120.0、150.0、180.0  $\mu\text{l}$ ,摇匀后置于沸水浴加热 30.0 min 后测定,平行测定 6 次。结果显示:当 PFB-Br 衍生剂加入量为 80.0  $\mu\text{l}$  时,测定值达到最高值。见图 3。

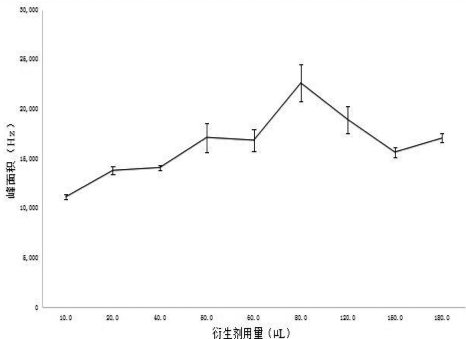


图3 PFB-Br 衍生计量曲线图(平行测定 6 次)

2.3 色谱条件的影响 本方法选择 DB-17 毛细色谱柱,气相色谱仪的进样量为 1.0  $\mu\text{l}$ ,分流比为 10:1。比较不同升温程序对目标峰的分离效能,程序 1 为:初温为 60  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 0.5 min,以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 180  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 5.0 min;程序 2 为:初温为 60  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 0.5 min,以 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  升至 200  $^{\circ}\text{C}$ ,保持 2.5 min。其他色谱条件均一致。两种程序的分离能力均好,目标峰的峰型

好,无重峰现象。但比较两者的峰面积,以加标量 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的样品为例,程序 1 测得峰面积为  $2.0\times 10^4$  Hz,程序 2 测得为  $2.0\times 10^5$  Hz,前者仅为后者的 1/10。因此,选择程序 2 为本法色谱条件的升温程序。

2.4 方法的线性范围、检出限和定量下限 在本研究条件下,唾液中氰离子的质量浓度在 0.0~200.0  $\text{mg}/\text{L}$  呈线性关系,线性相关系数为 0.999 4,回归方程为  $\hat{Y}=64\ 608X-2\ 415$ 。参照 GBZ/T 210.5 的方法和要求<sup>[12]</sup>,本法检出限为 0.007  $\text{mg}/\text{L}$ (3 倍噪声值计算),定量下限为 0.025  $\text{mg}/\text{L}$ (10 倍噪声值计算)。以唾液取样量 100.0  $\mu\text{l}$  计算,方法最低检出浓度为 0.07  $\text{mg}/\text{L}$ ,最低定量浓度为 0.25  $\text{mg}/\text{L}$ 。

2.5 回收率和精密度 以低中高质量浓度 3 组样品分别配制 0.70、1.20、1.80  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的  $\text{CN}^-$  加标唾液样品,每组设 6 个平行样品。以相同条件衍生,在同样的仪器条件下测定平行样品和空白唾液样品,计算样品的加标回收率和批内精密度;再通过不同人员以相同检测方法比对测定,计算批间精密度。结果显示:唾液氰离子的平均回收率(已扣空白)为 100.7%~102.1%;批内相对标准偏差(RSD)为 1.1%~3.8%( $n=6$ );批间相对标准偏差(RSD)为 2.4%~5.3%( $n=6$ )。见表 2。

表 2 准确度实验和精密度实验结果

组别	样品数 (个)	加标量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{ml}, \bar{x}\pm s$ )	加标回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间精密度		
						测定次数	实测值( $\mu\text{g}/\text{ml}, \bar{x}\pm s$ )	批间 RSD(%)
低质量浓度	6	0.70	0.71 $\pm$ 0.04	102.1	3.8	6	0.81 $\pm$ 0.06	4.8
中质量浓度	6	1.20	1.22 $\pm$ 0.04	101.8	2.2	6	1.40 $\pm$ 0.11	5.3
高质量浓度	6	1.80	1.81 $\pm$ 0.03	100.7	1.1	6	1.82 $\pm$ 0.06	2.4

2.6 稳定性实验 取 4 组样品,每组配制相当于 1.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的加标唾液样各 10 个,密封后避光于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存。分别以当天、3、7、15 d 对样品进行衍生反应后测定,分别计算衍生产物峰面积随保存时间的下降率。结果显示:当样品在 4  $^{\circ}\text{C}$  环境下保存 15 d 时,样品峰面积的下降率为 8.40%。说明样品在 4  $^{\circ}\text{C}$  下至少可保存 15 d。

2.7 干扰实验 通过文献检索,正常人群的口腔唾液常见无机阴离子有  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$  和  $\text{SCN}^-$ <sup>[13-15]</sup>。4 组唾液平行样品中, $\text{CN}^-$  加标浓度均为 1.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,1 组作为对照样品,其余 3 组分别加入 100.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$  和  $\text{SCN}^-$ ,以相同的衍生条件处理,与对照样品比较测得的衍生产物峰面积,实验结果显示,在本研究方法中,

唾液常见的  $\text{Cl}^-$ 、 $\text{F}^-$  和  $\text{SCN}^-$  对测定结果均无干扰。

3 讨论

3.1 检测方法的比较 李悦等<sup>[16]</sup>曾对多种测定氰化物的定量方法进行整理和比较。其中,气相色谱法因对强电负性物质高响应的 ECD 检测器,具有分离能力强、干扰少、特异性强、灵敏度高的优点;但目前的气相色谱法多为利用氯胺 T 衍生化的顶空气相色谱法<sup>[17]</sup>,或与质谱联用的方法<sup>[18]</sup>。顶空气相色谱法缺点在于所使用的氯胺 T 试剂稳定性差,对衍生反应条件以及顶空平衡条件要求高,易导致结果重现性不好;质谱法因使用内标法定量,每次测定时均需要准确称量待测物和内标物,操作繁琐。本研究方法利用衍生



气相色谱法原理,在缓冲溶液存在的条件下,以乙腈为溶剂,加入 PFB-Br 加热衍生后直接进样,外标法定量。方法最低定量浓度为 0.25 mg/L(以 100.0  $\mu$ l 唾液量计算),测定范围为 0.25 ~ 200.0 mg/L。本法的灵敏度高,需要的样品分析体积小,适合针对唾液取材测定的特点;同时简化了前处理和测定的步骤,方法准确度和精密度好,分析速度快。

**3.2 缓冲溶液的选择** 口腔唾液正常的 pH 值介于 5.6~7.6,平均为 6.8,偏酸性<sup>[19]</sup>。酸性条件下,  $\text{CN}^-$  易于变为 HCN 而损失,这是在没有缓冲溶液衍生结果不呈线性关系的主要原因。本法参考尿硫氰酸盐测定的标准方法<sup>[20]</sup>,当 pH=7.0 的磷酸盐缓冲溶液加入量为 100.0  $\mu$ l,乙腈定容 1.0 ml 的条件下,  $\text{CN}^-$  与 PFB-Br 衍生能定量反应,实验结果的线性关系最好。

**3.3 分析溶剂的选择** 乙腈是常用的蛋白沉淀剂,能沉淀唾液中的蛋白酶,避免堵塞色谱柱,同时也是能溶解  $\text{CN}^-$  的极性溶剂,因此适合用于唾液样品中  $\text{CN}^-$  的提取。但乙腈对 ECD 也有高响应值,易造成溶剂拖尾,随着乙腈加入量不同会造成衍生产物的目标峰偏移,因此样品分析和标准系列所用乙腈的加入量要保持一致。

**3.4 衍生条件的选择** 本法选择以沸水浴为加热条件,不需要高精密的恒温控温设备,提高方法的适用性,但要注意加热过程中样品溶液暴沸溢出损失。分析 2.2.2 和 2.2.3 的结果,加热对衍生反应的作用明显,但长时间加热并不利于衍生产物的稳定,存在最佳的加热时间;衍生剂在加入到一定量时反应结果趋于稳定,但过多的衍生剂反而稀释了样品,也容易污染色谱柱和检测器。根据实验结果,本法的衍生条件为:加入 100.0  $\mu$ l 缓冲溶液,取 100.0  $\mu$ l 唾液样品加入 80.0  $\mu$ l 的 PFB-Br 衍生剂,在沸水浴条件下加热 30.0 min 进行衍生反应,在此条件下方法的灵敏度最高。

**3.5 应用和结论** 职业性氰化物中毒多通过呼吸道和皮肤途径进入人体,而生活性氰化物中毒大多经口摄入,因此在氰化物中毒的病因调查中,本法很有应用价值和意义。本法适用于经口摄入的氰化物的定量检测,方法取材容易,前处理简单,测定方法准确可靠,样

品分析速度快,可应用于氰化物中毒的病因调查和应急检测。

## 参考文献

- [1] Tatli M, Eyüpoglu G, Hocagil H. Acute cyanide poisoning due to apricot kernel ingestion[J]. J Acute Dis, 2017, 6(2):742-744.
- [2] Dang T, Nguyen C, Tran PN, et al. Physician beware: severe cyanide toxicity from amygdalin tablets ingestion[J]. J Emerg Med, 2017, 2017(8):209-211.
- [3] 廖静, 李小峰, 罗丽燕, 等. 一起电镀车间氰化氢中毒事故的调查和反思[J]. 医学动物防制, 2017, 33(3):333-334.
- [4] 陈月, 李春晨. 基于事故树分析方法的氰化物中毒事故模式研究[J]. 辽宁化工, 2016, 45(7):863-864, 868.
- [5] 彭言群, 张建中, 龚喜. 长沙市高毒物品职业危害现状及干预对策研究[J]. 实用预防医学, 2011, 18(7):1208-1210.
- [6] 邓春拓, 何伦发, 郭艳, 等. 珠三角某市 2015 年出厂水中化学污染物健康风险评价[J]. 实用预防医学, 2017, 24(4):425-428.
- [7] 李腾, 黄桂兰, 袁铃, 等. 氰化物分析研究进展[J]. 化学分析计量, 2017, 26(2):115-119.
- [8] 李润玖, 张彧. 急性中毒诊治与流行病学调查[J]. 临床急诊杂志, 2012, 13(6):440-442.
- [9] 徐虹, 宋寅生, 曹文婷, 等. 氰化物中毒应急检测方法的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(11):1705-1707.
- [10] 黄森乐, 刘清华. 氰化物的检测方法[J]. 广东化工, 2014, 41(17):183, 185.
- [11] 谢梦洲, 贺佐梅, 周小青, 等. 唾液检测的应用进展[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(2):76-80.
- [12] 中华人民共和国卫生部. GBZ/T 210.5-2008 职业卫生标准制定指南 第 5 部分:生物材料中化学物质测定方法[S]. 北京:人民卫生出版社, 2008:1-6.
- [13] 陈蕾, 张维丹, 张媛媛. 氟离子对 2 种牙科常用合金耐腐蚀性的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(11):1186-1190.
- [14] 吴通华, 田真, 蒋琪, 等. 奎屯市成年人唾液中氟含量的调查[J]. 微量元素与健康研究, 2013, 30(1):44-45.
- [15] 荣丽, 吕明. 唾液中硫氰酸根离子的测定与研究[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2014, 33(5):26-29.
- [16] 李悦, 李彦懿, 肖得力. 氰化物定量检测方法应用研究进展[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(12):2075-2083.
- [17] 杜利君, 刘晓林, 高媛惠, 等. 顶空气相色谱法快速测定酒中氰化物含量[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(11):131-133.
- [18] 李想, 朱昱. 氨基衍生化-GC/MS/MS 法测定血中的氰离子[J]. 分析试验室, 2016, 35(10):1200-1202.
- [19] 樊明文. 牙体牙髓病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:35.
- [20] 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:人民卫生出版社, 1996:1-3.

收稿日期:2017-12-08