

离子色谱-安培检测法检测血液中的硫离子

黄勃琨¹, 张成龙¹, 晏晓军², 杨瑞琴^{1*}

(1. 中国人民公安大学 侦查学院, 北京 100083; 2. 湖南省公安厅物证鉴定中心, 湖南 长沙 410001)

摘要: 建立了一种离子色谱-安培检测法对硫化氢中毒血液中的硫离子进行分析。向血液检材中加入十水合四硼酸钠-甲酸溶液作为缓冲试剂, 使用甲醇沉淀蛋白, 高速离心, 取上清液调节pH值并过滤后, 采用离子色谱-安培检测法分析。实验结果表明, 硫离子在0.02~3.0 μg/mL范围内的线性关系良好(相关系数 $r^2=0.9991$), 检出限(LOD)和定量下限(LOQ)分别为0.0075 μg/mL和0.025 μg/mL, 基质效应为12.5%, 日内精密密度为4.1%~8.0%, 日间精密密度为8.5%~13%。基于健康人体新鲜血液样本的检测结果, 进一步提出了中毒诊断的建议阈值。该研究首次建立了用于血液中硫离子测定的离子色谱-安培检测法, 具有便捷高效、灵敏度高、操作简便等优点, 为法庭科学领域硫化氢中毒血液的检测提供了新的思路。

关键词: 离子色谱; 安培检测; 硫离子; 血液

中图分类号: O657.7; TQ125.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2025)12-2624-05

Determination of Sulfide Ions in Blood Based on Amperometric Detection of Ion Chromatography

HUANG Bo-kun¹, ZHANG Cheng-long¹, YAN Xiao-jun², YANG Rui-qin^{1*}

(1. School of Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100083, China; 2. Institute of Forensic Science, Hunan Provincial Public Security Bureau, Changsha 410001, China)

Abstract: A new method of ion chromatography with amperometric detection was established to detect sulfide ions in blood poisoned by hydrogen sulfide. Sodium tetraborate-formic acid solution was added to the blood sample as a buffer reagent, and the protein was precipitated by methanol. After high-speed centrifugation, the supernatant was taken to adjust the pH, filtered by a 0.22 μm organic phase syringe filter, and the sulfide ions in the blood were qualitatively and quantitatively analyzed by ion chromatography-amperometric detector. The experimental results showed that the sulfide ion concentration showed a good linear relationship in the range of 0.02~3.0 μg/mL (correlation coefficient $r^2=0.9991$), the detection limit (LOD) and quantitative limit (LOQ) were 0.0075 μg/mL and 0.025 μg/mL, respectively, the matrix effect was 12.5%, the intra-day precision was 4.1%~8.0%, and the inter-day precision was 8.5%~13%. Based on the detection results of fresh blood samples from healthy individuals, this study proposes a diagnostic threshold for poisoning. In this study, an ion chromatography-amperometric detector method for the determination of sulfide ions in blood was established for the first time, which has the advantages of convenience, high efficiency, high sensitivity and simple operation, and provides a new idea for the detection of blood poisoned by hydrogen sulfide in forensic science.

Key words: ion chromatography; amperometric detection; sulfide ion; blood

硫化氢(H₂S)是一种无色剧毒气体, 具有强烈臭鸡蛋气味。在石油、化工、皮革、造纸、煤矿开采等行业中广泛存在, 并易发生中毒事件, 是法庭科学领域常见的有毒气体^[1]。硫化氢通过与细胞呼吸链中的酶结合阻断细胞呼吸, 导致细胞缺氧, 进而损害中枢神经系统, 可能引起电击样死亡^[2]。不同浓度H₂S对人体具有不同的影响, 低浓度下主要是对眼和呼吸道黏膜的刺激作用, 可引起化学性炎症和肺水肿。高浓度下则表现对中枢神经系统和全身的毒性作用^[3]。

目前常见的H₂S检验方法有化学法^[4]、气相色谱法^[5-7]、液相色谱法^[8]、荧光探针分析法^[9-10]、光谱

收稿日期: 2025-04-02; 修回日期: 2025-05-28

基金项目: 2024年度中国人民公安大学基本科研业务费(2024JKF08)

*通讯作者: 杨瑞琴, 博士, 教授, 研究方向: 法庭化学, E-mail: yangruiqin@ppsuc.edu.cn

网络首发时间: 2025-10-20

法^[11-12]等。在法庭科学领域,血液中 H_2S 的检测方法主要有两种:一种是在酸性条件下将硫离子转化为 H_2S 分子,然后通过气相色谱分析;另一种是在碱性或中性条件下使用五氟苄基溴衍生法,将硫化物转化为双五氟苄硫醚,再通过气相色谱-质谱联用技术进行检测。这两种方法都存在一定问题:第一种方法, H_2S 分子在传输过程中,容易对仪器造成腐蚀,导致仪器灵敏度下降、仪器寿命损耗等,此外, H_2S 分子较小,极性大,使用普通气相色谱柱进样存在峰形差、难以保留等问题^[6];第二种方法是目前较为常用的方法,但其样品处理过程较为繁琐,需要用到多种试剂,试剂的加入顺序与反应时间对实验结果有较大影响,且衍生化成本较高^[7]。因此, H_2S 中毒血液的检测仍是法庭科学领域的一个重要研究方向。

近年来,离子色谱法凭借高效、简便、灵敏等优点逐渐应用于 H_2S 的测定^[13]。安培检测器对硫离子有特异性响应,可直接检测液体中的硫离子含量,而使用离子色谱-安培检测法检测血液中硫离子含量的研究尚未见相关报道。基于此,本文基于离子色谱-安培检测法,建立了一种高灵敏度、简便快速测定人体血液中硫离子的方法,该法无需复杂衍生化步骤,可为相关中毒事件和基层公安工作处理 H_2S 中毒案件提供方法参考,也为社会公共安全领域的快速检测提供了方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ICD 300+离子色谱仪,配备SHE-8 ECD安培检测器和SHA-16 AUTOSAMPLER自动进样器(青岛盛瀚色谱技术有限公司);Eppendorf 5804高速离心机、移液器(德国Eppendorf公司);VORTEX 2涡旋振荡器(德国IKA公司);KQ3200DE超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q超纯水仪(德国Merck公司);AUW220D电子天平(日本岛津公司);0.22 μm 有机相针式过滤器(浙江哈迈科技有限公司)。

甲醇、乙醇、丙酮、乙腈(色谱纯,美国Thermo Fisher公司), $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 标准品(纯度 $\geq 98.0\%$),NaOH标准品,甲酸(纯度 $\geq 99.0\%$),十水合四硼酸钠(纯度 $\geq 99.5\%$),抗坏血酸(纯度99.99%);去离子水由Milli-Q超纯水仪制得。

1.2 缓冲溶液配制

称取十水合四硼酸钠5.0 g,溶于50 mL超纯水中,超声溶解后加入甲酸,以pH计校准至pH 6.50 \pm 0.05,定容至100 mL,作为缓冲溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。称取0.3 g抗坏血酸,溶于10 mL超纯水,临用前加入缓冲溶液中。

1.3 标准溶液配制

称取74.902 mg的 $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 标准品溶于10 mL超纯水,制成硫离子质量浓度1.0 g/L的标准溶液,再稀释成10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准中间液,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 以下冷藏。根据实验需要,移取10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,稀释成不同浓度的标准工作液,现配现用。

1.4 样品前处理

取0.4 mL血液检材于离心管中,加入0.4 mL的缓冲溶液,振荡3.0 min,再加入1.2 mL预冷甲醇,振荡5.0 min,以11 000 r/min转速离心15 min,取1.2 mL上清液加入0.1 mol/L NaOH溶液调至pH 12.0 \pm 0.2,用0.22 μm 有机相针筒过滤器过滤,作为检材提取液进样至离子色谱-安培检测器进行检测分析。

1.5 色谱条件

离子色谱柱:SH-AC-14(硫离子、氰离子分析专用色谱柱,青岛盛瀚色谱技术有限公司),保护柱:SH-GP-2(peek材质,青岛盛瀚色谱技术有限公司)。淋洗液:25.0 mmol/L氢氧化钠-12.5 mmol/L乙酸钠-0.2%乙二胺;进样量:25.0 μL ;流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.6 安培检测器条件

模式:直流, $E=0.050\text{ V}$;量程:2 μA ;工作电极:银电极;参比电极:钨电极;温度:35 $^{\circ}\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件优化

本研究依次对淋洗液浓度和淋洗液流速进行考察。分别使用(1)100 mmol/L NaOH-50 mmol/L 乙酸钠-0.2% 乙二胺、(2)50 mmol/L NaOH-25 mmol/L 乙酸钠-0.2% 乙二胺、(3)25 mol/L NaOH-12.5 mmol/L 乙酸钠-0.2% 乙二胺 3 种浓度配比的淋洗液进行等度淋洗。结果显示, 3 种淋洗液均可在较短时间完成对硫离子的分离, 但第 3 种峰形更优, 基线更稳定, 硫离子出峰效果较好, 且低浓度条件下, 有利于节省淋洗成本, 故选择第 3 种淋洗液浓度进行等度淋洗。

在预设的淋洗液浓度下, 对 4 种不同淋洗液流速(0.6、0.8、1.0、1.2 mL/min)进行考察。结果显示, 当淋洗液流速为 0.6 mL/min 或 0.8 mL/min 时, 由于洗脱速度较慢, 硫离子在短时间内难以完成检验; 淋洗液流速为 1.0 mL/min 时, 分离效果较好, 满足定性定量要求; 当淋洗液流速提升至 1.2 mL/min 时, 洗脱速度过快, 导致硫离子色谱峰出现拖尾, 且与后续杂质峰保留时间相近, 分离度降低。因此, 选择 1.0 mL/min 的流速进行洗脱。

2.2 前处理方法优化

在法庭科学领域, 蛋白质沉淀法是最为常用的生物样本前处理技术之一。本研究系统考察了甲醇、乙醇、乙腈、丙酮 4 种有机溶剂的沉淀效果, 通过向血液中分别添加等体积溶剂进行对比实验。结果表明, 甲醇因其极性特征(介电常数 $\epsilon=32.7$), 更易溶解作为极性分子的分子态 H_2S , 且羟基与 H_2S 形成分子间氢键, 可显著提升 H_2S 的分配系数($\log P=1.45$)。此外, 甲醇形成的蛋白质沉淀网络结构更为疏松(平均孔径 > 50 nm), 有效降低了目标物包裹损失, 综合性能显著优于其他溶剂^[14], 故选定甲醇为最佳沉淀剂。

体系 pH 值对提取效率具有重要调控作用: 在弱酸性条件(pH 6.5)下, 硫离子主要以分子态 H_2S 形式存在(占比约 86%, $pK_{a1}=7.0$), 其脂溶性显著高于离子态 HS^- , 可促使目标物高效分配至甲醇相。但当 pH 值降至 4.7 时, 接近血浆蛋白等电点, 蛋白质沉淀将减少水相残留; 而 $pH < 6.0$ 时, 过量甲酸可能通过增强水相离子强度, 导致 H_2S 因水合作用滞留水相, 并引发巯基化合物氧化^[15]。综上, 选择 pH 6.5 为平衡分配效率与目标物稳定性的最佳条件。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、检出限与定量下限 向空白血液中梯度添加硫离子标准溶液, 对应血液中添加硫离子的质量浓度分别为 0.02、0.1、0.5、1.0、2.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$, 按照“1.4”处理样品, 以稀释后血液中硫离子质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标, 其定量峰面积(y , nC)为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 添加 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 硫离子的血液样本离子色谱图见图 1。结果表明, 硫离子在质量浓度 0.02~3.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性良好, 相关系数(r^2)为 0.999 1, 线性方程为 $y=2792.52x-18.57$ 。以 $S/N=3$ 时对应的质量浓度为检出限(LOD), 以 $S/N=10$ 时对应的质量浓度为定量下限

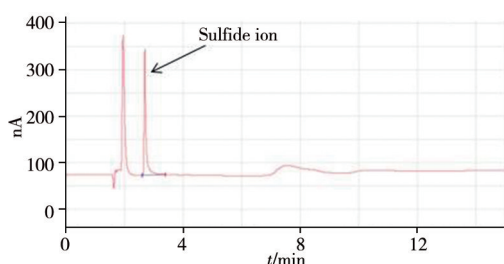


图 1 添加 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 硫离子的血液样本离子色谱图

Fig. 1 Ion chromatogram of blood sample added with 0.5 $\mu\text{g/mL}$ sulfide ion

(LOQ)。本方法的 LOD 为 0.007 5 $\mu\text{g/mL}$, LOQ 为 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 。高于以往报道的气相色谱-质谱联用法的检出限(0.05 $\mu\text{g/mL}$)^[5], HS-GC-FPD 法检出限(0.05 $\mu\text{g/mL}$)和定量下限(0.1 $\mu\text{g/mL}$)^[6], 略低于 LC-MS/MS 法检出限(0.005 $\mu\text{g/mL}$)和定量下限(0.01 $\mu\text{g/mL}$)^[2], 具有较高灵敏度。

2.3.2 回收率与精密度 向空白血液中添加硫离子标准工作溶液, 并分别制备成 0.02、1.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 3 种不同质量浓度的空白加标检材。按照“1.4”步骤处理, 在进样时以质量浓度由低至高依次进样, 获得回收率与精密度数据。基于优化的离子色谱-安培法检测条件, 在同一天的早、中、晚 3 个时间段内, 对 3 种不同浓度的检材进行系统分析, 每种浓度样品均重复进样 6 次, 通过目标物的峰面积计算相对标准偏差(RSD), 得出 3 种浓度下的日内精密度; 将 3 种浓度的空白加标检材, 每天进行 6 次进样, 连续进行 6 天, 通过目标物的峰面积计算 RSD, 得出 3 种浓度下的日间精密度。计算得到的日内

精密密度为 4.1%~8.0%，日间精密密度为 8.5%~13%，提取回收率为 84.2%~107%，见表 1。结果表明，该方法具有良好的回收率与精密密度，符合生物样品分析方法学的验证要求，适用于血液样品中硫离子的系统分析。

表 1 血液中硫离子在不同加标水平下的回收率和日内、日间精密密度($n=6$)

Table 1 Recoveries and intra-day and inter-day precisions of sulfide ions in blood at different addition levels($n=6$)

Added/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Found/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Recovery/%	Intra-day RSD/%	Inter-day RSD/%
0.02	0.017	84.2	8.0	13
1.0	0.969	96.9	4.1	8.5
3.0	3.195	107	5.7	9.8

2.3.3 基质效应 血液检材内部成分繁多，研究基质效应对于确保实验可靠性至关重要。本实验通过检测低、中、高 3 种浓度血液基质标准溶液及标准工作液中硫离子的峰面积，比较 3 个不同浓度下的信号峰面积平均值，其中，以硫离子标准工作液的峰面积为 A ，空白血液提取后添加对应浓度硫离子的峰面积为 B ，空白血液提取前添加对应浓度硫离子的峰面积为 C ，则基质效应($\%$)= $(B/A-1)\times 100$ ，提取回收率($\%$)= $C/B\times 100$ 。结果表明，硫离子在血液中的基质效应绝对值为 12.5%，小于 15%，故血液基质成分对硫离子测定的干扰程度符合国际通行的分析方法验证标准，可用于对实际血液样本中的硫离子进行准确分析。

2.4 空白血液硫浓度阈值

安培检测器对硫离子具有高特异性和高灵敏度的检测效果，可在实际检测过程中测得血液中的内源性硫离子，因此需通过大量积累实验数据，找到外源性 H_2S 的中毒阈值。同时，血液腐败过程中，同样会产生一定程度硫离子，对实验结果造成干扰。Kage 等^[16]曾报道空白血液中的 H_2S 浓度不高于 $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，死后 24 h 内，低温保存的血液中 H_2S 的产生受到抑制，在 4°C 的冰箱中， H_2S 浓度在一周内升高约 10%^[17]。

本研究通过对 20 例新鲜血液中硫离子浓度随时间的变化进行检测分析，对人体血液中内源性硫离子的浓度进行了考察，运用数学方法初步得到人体血液中的硫浓度阈值。结果(表 2)表明，20 例健康人新鲜血液中硫离子的质量浓度为 $0.0316\sim 0.043 \mu\text{g}/\text{mL}$ (均值 \pm SD: $(0.037\pm 0.004) \mu\text{g}/\text{mL}$)，血液在 4°C 冷藏条件下保存 3 周后，硫离子质量浓度升至 $0.0402\sim 0.0532 \mu\text{g}/\text{mL}$ (均值 \pm SD: $(0.047\pm 0.005) \mu\text{g}/\text{mL}$)。因此，在新鲜血液中，硫离子浓度低于公认的空白血液中硫离子浓度，尽管随着时间的变化，硫离子浓度不断升高，但均未超过 $0.0532 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，且个体差异较小(RSD=8.9%)，事实上生成的量不足以影响 H_2S 的中毒测定。Kyoko 等^[18]通过对 17 例 H_2S 中毒死亡案件的剖析，发现除口服途径中毒外，血液中硫离子浓度与尸检间隔时间无明显相关性。目前报道的 H_2S 中毒案件中，中毒者血液中硫离子的质量浓度为 $0.11\sim 31.84 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，口服含硫液体中毒者血液中硫离子浓度比正常高 20 倍以上，为 $30.4\sim 131.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[5]。故空白血液中的硫离子浓度不影响 H_2S 中毒的判断，血液中硫离子浓度仍可作为推断 H_2S 中毒的重要指标。因此，结合文献报道和本研究测得数据，将外源性硫离子浓度阈值定为 $0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$ ，即当新鲜血液中硫离子浓度超过此值时，可判定为外源性 H_2S 暴露。

表 2 空白血液中的硫离子浓度

Table 2 Sulfide ion concentration in blank bloods

Sample	Concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	
	Fresh blood	Blood after three weeks
1	0.0316	0.0402
2	0.0362	0.0452
3	0.0398	0.0518
4	0.0430	0.0532
5	0.0390	0.0506
6	0.0358	0.0462
7	0.0334	0.0412
8	0.0348	0.0438
9	0.0406	0.0526
10	0.0368	0.0466
11	0.0350	0.0446
12	0.0318	0.0406
13	0.0420	0.0530
14	0.0338	0.0432
15	0.0382	0.0478
16	0.0374	0.0470
17	0.0408	0.0518
18	0.0372	0.0472
19	0.0332	0.0422
20	0.0394	0.0452

3 结 论

本文通过对前处理条件的优化，建立了离子色谱-安培检测法测定人体血液中硫离子的方法，对血液中的硫浓度阈值进行了探讨。方法的检出限和定量下限分别低至 $0.0075 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $0.025 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

相比传统方法,该法操作过程简便,无需进行繁琐的衍生化步骤,大大节省了检测时间和成本,适合于疑似H₂S中毒案件的快速筛查与确证,对血液中硫离子的检验筛查具有一定探索意义,为法庭科学领域相关案件的侦破提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Pudi A, Rezaei M, Signorini V, Andersson M P, Baschetti M G, Mansouri S S. *Sep. Purif. Technol.*, **2022**, 298: 121448.
- [2] Qin G, Wu X J, Wei C M, Zhao P, Li J Y, Chang J, Zhang Y F. *Microchem. J.*, **2024**, 204: 111140.
- [3] Zhang Z, Zhang Y F, Wu X J, Wang J F, Lu P W. *Chin. J. Anal. Lab.* (张震, 张云峰, 吴小军, 王继芬, 鲁朋武. 分析实验室), **2023**, 42(10): 1406-1411.
- [4] Kolluru G K, Shen X, Bir S C, Kevil C G. *Nitric Oxide*, **2013**, 35: 5-20.
- [5] Qiang H S, Chen H, Shen B H, Shen M, Xiang P. *J. Forensic Med.* (强火生, 陈航, 沈保华, 沈敏, 向平. 法医学杂志), **2017**, 33(2): 148-153.
- [6] Zhang Z, Wu X J, Wei C M, Zhao P, Wang J F, Yu Z S, Zhang Y F. *Chin. J. Forensic Med.* (张震, 吴小军, 魏春明, 赵鹏, 王继芬, 于忠山, 张云峰. 中国法医学杂志), **2022**, 37(5): 471-474, 484.
- [7] Hou F, Tang Z L, Hu H N, Li H G. *Forensic Sci. Technol.* (侯方, 唐志龙, 胡浩男, 厉洪光. 刑事技术), **2020**, 45(1): 60-63.
- [8] Meng X Y, Zhang A, Li C Y. *China Med. Equip.* (孟祥宇, 张翱, 李春艳. 中国医学装备), **2024**, 21(2): 42-47.
- [9] Liu F R, Yan L, Fan Z F, Wen X Y. *J. Instrum. Anal.* (刘芙蓉, 闫丽, 范哲锋, 温晓焯. 分析测试学报), **2022**, 41(5): 701-709.
- [10] Song J T, Yuan Y H, Zhu Y J, Wang Y Z, Tian M Z, Feng F. *Spectrosc. Spectral Anal.* (宋江涛, 袁跃华, 朱永军, 王玉珍, 田茂忠, 冯锋. 光谱学与光谱分析), **2022**, 42(11): 3321-3329.
- [11] Cao X W, Lin W Y, He L W. *Org. Lett.*, **2011**, 13(17): 4716.
- [12] Kumar V, Sakla R, Sharma N, Kanika, Khan R, Jose D A. *Chempluschem*, **2023**, 88(9): e202300243.
- [13] Gao X J, Ni T, Shen R, Shi C O. *Chin. J. Chromatogr.* (高晓静, 倪彤, 沈睿, 施超欧. 色谱), **2024**, 42(8): 766-772.
- [14] Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvanan V, Grant R. *J. Chromatogr. B*, **2003**, 785(2): 263-275.
- [15] Nagy P, Pálkás Z, Nagy A, Budai B, Tóth I, Vasas A. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1840(2): 876-891.
- [16] Kage S, Nagata T, Kudo K. *J. Anal. Toxicol.*, **1991**, 15(3): 148-150.
- [17] McAnalley B H, Lowry W T, Oliver R D, Garriott J C. *J. Anal. Toxicol.*, **1979**, 3(3): 111-114.
- [18] Kyoko M, Kimiharu I, Kentaro S, Akihiro T, Kenji F, Miwako A, Eriko O, Tomonori N. *Forensic Sci. Int.*, **2011**, 207(1/3): 91-95.

(责任编辑: 盛文彦)