

标本类型单一,标本从采集到送检的过程也影响检测结果,因此,方法改进后的结果与临床诊断仍未完全符合;另外鉴于菌株存在变异,故在全国其他省市的检出情况是否一致尚有待证实。

尽管目前 RT-PCR 对 CVA16 的检出率较低,但由于商品化 real-time 检测试剂成本过高,现大部分地市仍采用该方法。近年来,CVA16 和 EV71 的交替出现,成为不同时间、不同地区的流行毒株<sup>[13]</sup>,而实验室检测结果将直接影响对疫情的科学判断和预测。因此,建议《指南》重新推荐更好的 CVA16 引物,以利于各地更好地开展工作。

参考文献

[1] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998 [J]. The Pediatric Infectious Disease Journal, 1999, 18(12): 1092-1096.  
 [2] Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, et al. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications [J]. Reviews in Medical Virology, 2007, 17(6): 371-379.  
 [3] Oberste MS, Nix WA, Maher K, et al. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing [J]. Journal of Clinical Virology: the Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2003, 26(3): 375-377.

[4] 王婷婷, 朱汝南, 钱渊, 等. 肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型多重反转录-聚合酶链反应的建立及初步应用 [J]. 微生物与感染, 2011, 6(1): 11-17.  
 [5] Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16 [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(6): 2212-2219.  
 [6] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2009 版) [EB/OL]. [2009-06-04]. Http://www.moh.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/mohbgt/s3582/200906/41047.htm.  
 [7] 张新宇, 高燕宁. PCR 设计技巧及软件使用技巧 [J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18.  
 [8] 何丽芸, 何雅青, 张利平, 等. 肠道病毒核酸快速定量检测方法建立 [J]. 中国公共卫生, 2010, 26(3): 383-384.  
 [9] 唐彦, 侯俊, 徐军, 等. 实时荧光 PCR 检测手足口病病原体的建立及初步应用 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(2): 152-154.  
 [10] 严菊英, 卢亦愚, 徐昌平, 等. 肠道病毒 EV71 荧光定量 RT-PCR 法快速检测 [J]. 中国公共卫生, 2009, 25(7): 843-844.  
 [11] 廖国东, 吴文锋, 许桂锋, 等. 实时荧光 PCR 技术在手足口病检测中应用 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(11): 1097-1098.  
 [12] Thao NT, Ngoc NT, Tú PV, et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 170(1-2): 134-139.  
 [13] 孙军玲, 张静. 手足口病流行病学研究进展 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(9): 973-976.

收稿日期: 2012-07-15

(韩仰欢编辑 周欣琳校对)

• 检验技术 •

## 发砷 DDC - Ag 分光光度法测定实验条件筛选

翟城<sup>1,2,3</sup>, 张志瑜<sup>2</sup>, 郑宝山<sup>1</sup>

关键词: 二乙氧基二硫代甲酸银 (DDC - Ag); 正交设计; 发砷测定

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)05-0757-03

砷暴露可引起慢性中毒、皮肤癌、肺癌及消化系统的癌症等。组织中砷含量反映机体砷暴露水平和蓄积程度,多以取样方便的毛发、指(趾)甲为测定对象<sup>[1]</sup>。二乙氨基二硫代甲酸银 (silver diethyldithiocarbamate, DDC - Ag) 法是砷定量检测的经典化学方法,也是在砷中毒诊断和防治工作中普遍使用的方法,但该方法试剂多、测定过程复杂、样品需预处理<sup>[2]</sup>。不同地区、不同实验室对正常人群头发样品的砷含量测定的结果差异很大<sup>[3]</sup>,样品消化、测定条件等可能是重要原因。本研究对头发样品消化条件、砷测定方法中的相关影响因素进行探讨,为准确

测定砷含量提供技术支撑。

### 1 材料与方法

1.1 实验设计方案 根据砷的测定过程和原理,以发样砷测定为例将样品消解过程中使用的氧化剂 (因素 A)、赶酸方式 (因素 B)、赶酸时间 (因素 H)、测定过程中的反应温度 (因素 F)、反应时间 (因素 G) 及氯化亚锡用量 (因素 D)、Zn 粒用量 (因素 E)、加水量 (因素 I)、赶酸时尿素或草酸铵静置时间 (因素 C) 9 个可能影响砷测定结果的因素各分为 3 水平 (K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>、K<sub>3</sub>)。以 X<sub>i</sub>(i=1, 2, 3) 表示第 X 个因素的第 i 水平,各因素水平如下: A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 分别为硝酸、过氧化氢、高氯酸; B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 分别为 H<sub>2</sub>O、CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub> 分别为 0、15、30 min; D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 分别为 0.125、0.50、1.00 mL; E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub> 分别

作者单位: 1. 中国科学院地球化学研究所 环境地球化学国家重点实验室 贵州 贵阳 550002; 2. 中国医科大学公共卫生学院; 3. 中国科学院研究生院

作者简介: 翟城(1964-)男,河北保定人,副教授,博士,研究方向: 地球化学性疾病。

为 3.0、3.5、4.0 g;  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $F_3$  分别为 12、22、32 °C;  $G_1$ 、 $G_2$ 、 $G_3$  分别为 45、60、80 min;  $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$  分别为 0、30、60 min;  $I_1$ 、 $I_2$ 、 $I_3$  分别为 15.0、20.0、25.0 mL。按照正交设计原理和因素的水平设计成  $L_{27}(3^{13})$  表,按正交表安排各因素进行实验。

1.2 主要仪器及试剂 测砷装置(河间市天宫玻璃仪器厂) 722 分光光度计及配套石英 10 mm 比色杯(上海精密科学仪器有限公司)。混合酸(由 2 体积硫酸与 5 体积硝酸混合而成)、过氧化氢、高氯酸、氢氧化钠、吡啶(北京化学试剂厂),三氧化二砷标准品(基准试剂,北京化学试剂厂),15% 碘化钾、40% 氯化亚锡(4.0 g 氯化亚锡溶于 10 mL 浓盐酸中)、醋酸铅棉花(将脱脂棉浸于 50% 醋酸铅中,浸泡 1 h,自然干燥)、20~30 目无砷锌粒、DDC-Ag、尿素、草酸铵(北京化学试剂厂)。显色剂吸收液、砷标准液(标准贮备液含 1.0 mg/mL 的砷、标准应用液 1 μg/mL 砷)按国标方法<sup>[4]</sup>配制。

1.3 样品处理与检测

1.3.1 样品处理 (1) 样品预处理:将未经污染样品剪成 10 mm 左右长度,在 0.25 mol/L 氢氧化钠溶液中浸泡 4 h,用蒸馏水清洗干净(水为中性),烤至恒重。(2) 样品消化:称取 1.0 g 发样于 150 mL 锥形瓶中,加入 14 mL 混合酸置于电热板上加热,当瓶中出现棕色气体,发样变白、消失,液体开始沸腾、变为深棕色,将温度调低,并分别进行以下处理:分若干次少量滴加浓硝酸、过氧化氢、高氯酸,至瓶内液体变为近于清亮透明。冷却至室温,然后分别加入 15、20、25 mL 蒸馏水置电热板上继续加热煮沸、挥发至液体剩 3~4 mL;加入 45% 尿素 1.5 mL,室温下作用 0、15、30 min 后置电热板上加热 0、30、60 min 测定;加入 25% 草酸铵 1.5 mL,室温下作用 0、15、30 min 后置电热板上加热 0、30、60 min 测定。

1.3.2 发砷测定 按实验方案分别向锥形瓶中加入

25 mL 蒸馏水,15% 碘化钾 2 mL,40% 氯化亚锡 0.125、0.5、1.0 mL 混匀放置 15 min。在刻度管中装入 4.0 mL DDC-Ag 吡啶吸收液,连接好砷发生装置,向瓶内分别放入 3.0、3.5、4.0 g 无砷锌粒并立即连好塞口,按设计要求分别在 12、22、32 °C 下反应 45、60 或 80 min。显色反应终止后,用 10 mm 比色杯,在 535 nm 波长下用 722 型分光光度计比色。

1.3.3 标准工作曲线 于砷发生器中加入砷标准应用液 0.0、0.3、0.5、1.0、5.0、7.0、12.0 mL,再加入 1:1 硫酸 7 mL,15% 碘化钾 2 mL,40% 氯化亚锡 0.125 mL 混匀放置 15 min。在刻度管中装入 4.0 mL DDC-Ag 吡啶吸收液,连接好砷发生装置,向瓶内放入 4 g 无砷锌粒并立即连好塞口使其不漏气,32 °C 反应 60 min,显色反应终止后的比色与 1.3.2 发砷测定相同。

1.4 统计分析 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同实验条件下发砷测定结果 选择高氯酸作为氧化剂的发砷测定光密度值(0.082 ± 0.018)高于使用过氧化氢的(0.047 ± 0.015);尿素和草酸铵静置作用时间为 15 min 时测得的光密度最大为(0.064 ± 0.029);反应温度最高水平时测得的值最大为(0.075 ± 0.014)。

2.2 正交设计极差法对最优试验条件选择(表 1) 根据表 1 中极差 R,水平 K,列 1、2、3、4 是误差估计列,用平均  $\bar{R}_e$  0.075 衡量 RA、RB、RC、RD、RE、RF、RG、RH、RI,其中  $> \bar{R}_e$  1.5 倍的处理因素有 A(氧化剂种类)、C(赶酸时尿素草酸铵静置时间)、F(反应温度)均可以判定为影响本实验结果的主要因子。其最优条件为 A1/C2/F3。

表 1 正交设计极差法结果

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	1	2	3	4
K1	0.477	0.540	0.531	0.576	0.522	0.414	0.567	0.531	0.549	0.549	0.576	0.504	0.558
K2	0.423	0.531	0.612	0.549	0.549	0.549	0.513	0.558	0.504	0.549	0.549	0.585	0.576
K3	0.783	0.567	0.495	0.513	0.567	0.675	0.558	0.558	0.576	0.549	0.513	0.549	0.495
R	0.360	0.036	0.117	0.063	0.045	0.261	0.054	0.027	0.072	0.000	0.063	0.081	0.081

2.3 方差分析结果(表 2) 方差分析结果显示,其中氧化剂、尿素草酸铵静置作用时间与反应温度的  $F$  值  $> F_{0.01}(2, 24)$ ,  $P < 0.01$ , 差异有统计学意义。

2.4 实验方法精密度与准确度 充分考虑实验应用的广泛性,选择低、中、高 3 个水平含砷量样品,进行精密度和加标回收试验。不同发砷水平下的重现性实验结果表明,变异系数在不同砷含量水平均 <

5% 符合精密度要求。头发样本加标回收试验结果表明,低砷(0.30~0.50 μg)水平时,方法回收率为 93.0%~96.29%,中砷水平(1.00~1.50 μg)回收率为 91.54%~98.17%,高砷水平( $\approx$ 5.00 μg)回收率为 94.84%~101.02%,总体回收率范围为 90%~105% 符合化学分析方法对实验结果准确度要求。

表 2 方差分析结果

因素	变异来源	SS	df	MS	F 值	P 值
氧化剂类别	组间	0.006 35	2	0.003 175	49.39	<0.01
赶酸方式	组间	0.000 07	2	0.000 035	0.54	>0.05
静置时间( min)	组间	0.000 85	2	0.000 425	6.61	<0.01
氯化亚锡量( mL)	组间	0.000 19	2	0.000 095	1.48	>0.05
锌粒克数( g)	组间	0.000 14	2	0.000 070	1.09	>0.05
反应温度( °C)	组间	0.003 67	2	0.001 835	28.54	<0.01
反应时间( min)	组间	0.000 19	2	0.000 095	1.48	>0.05
赶酸时间( min)	组间	0.000 05	2	0.000 025	0.39	>0.05
加水量( mL)	组间	0.000 29	2	0.000 145	2.26	>0.05
	组内	0.001 54	24	0.000 064		

### 3 讨论

砷能够与酶蛋白分子的巯基紧密结合<sup>[5]</sup>并在头发中固定下来。头发是人体中砷含量最高的组织之一,由于砷与巯基紧密结合不能直接检测,在测发砷前需将头发充分消化,使样品消解砷游离以达到准确测定发砷含量目的。氧化剂高氯酸在消化过程中可能引入其他未知因素使得测量值偏高(空白对照光密度值为 0.085),故舍弃高氯酸;由于硝酸可以与硫酸形成  $\text{NO} - \text{HSO}_4$  而使结果偏低,所以本研究选择先用硝酸再用过氧化氢作为氧化剂。由于  $\text{NO} - \text{HSO}_4$  有剩余时在下一步加锌反应中产生棕色  $\text{NO}$ ,干扰测定使结果偏高,所以必须赶酸彻底,但同时也不能加入过多的水,这会延长赶酸时间,造成引入其他潜在未知因素的机会增加。尿素和草酸铵作用时间不宜太短,如果作用不完全,不能彻底消除

$\text{NO} - \text{HSO}_4$ ,但如果作用时间太长又可能产生其他副产物。测定时环境温度高测得的值偏高,相反,温度低测得的结果就偏低,所以,建议在进行同类实验时,应注意其可比性。本方法最优条件是:选择硝酸和过氧化氢作氧化剂,静置时间为 15 min,反应温度 32 °C。该方法精密度、准确度较高。

#### 参考文献

- [1] 王连方. 地方性砷中毒与乌脚病[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1997: 54-61.
- [2] 李凤萍. 微量砷的测定方法[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(8): 745-746.
- [3] 高兆华, 钱琴芳, 卢志坚. 人群发砷正常参考值的研究[J]. 环境与健康杂志, 1993, 10(6): 246-249.
- [4] 仓公敖, 滕小沛, 吉钟山, 等. GB/T 5009.11-2003 食品中总砷及无机砷的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [5] 孟紫强. 砷的分子毒理学研究进展[J]. 中国公共卫生, 1998, 14(9): 570-573.

收稿日期: 2012-07-15

(解学魁编辑 周欣琳校对)

### • 检验技术 •

## 光电光度法与国标法测定甲醛对比分析

刘金忠<sup>1</sup>, 纪瓊伦<sup>1</sup>, 马英顺<sup>1</sup>, 宫大伟<sup>1</sup>, 冯智田<sup>2</sup>, 姜恩明<sup>3</sup>, 王芳芳<sup>4</sup>

关键词: 甲醛; 光电光度法; 酚试剂分光光度法; 比对

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)05-0759-02

甲醛是一种具有强刺激性的、无色易溶的气体,被国际癌症研究机构确定为致癌物和致畸物质<sup>[1-2]</sup>。室内环境的甲醛主要来自装饰材料、家具

及日常生活化学品的释放,吸烟也会释放甲醛,其中人造木板是造成室内甲醛污染的主要来源之一<sup>[3]</sup>。甲醛的测定方法主要有酚试剂分光光度法、气相色谱法等,但方法均需先在监测现场采集气体样品,再回实验室分析,分析周期长、成本高、步骤繁琐,不能实时地反映室内空气甲醛污染的状况及满足现场批量监测的要求<sup>[4-6]</sup>。与化学法相比,光电光度法测

作者单位: 1. 辽宁省疾病预防控制中心环境卫生安全所,沈阳 110005; 2. 辽宁省卫生计生厅卫生监督局; 3. 沈阳铁路疾病预防控制中心; 4. 大连医科大学

作者简介: 刘金忠(1973-),男,辽宁沈阳人,副主任技师,本科,主要从事环境卫生工作。