

硝酸-过氧化氢脱蛋白-石墨炉原子吸收法测定全血中铅

黄会秋

摘要: [目的] 建立一种新的血铅石墨炉原子吸收快速测定法。[方法] 采用含 40 mL/L 硝酸与 6 mL/L 过氧化氢的混合提取液, 离心分离脱去全血中的蛋白, 以磷酸二氢铵+硝酸镁为基体改进剂, 石墨炉原子吸收光谱法直接上机测定。[结果] 该方法的线性范围为 10~400 $\mu\text{g/L}$, 最低检出限为 4 $\mu\text{g/L}$, 加标回收率为 87.8%~115.3%, 相对标准偏差(RSD)为 3.6%~8.6%。[结论] 该新的血铅石墨炉原子吸收快速测定方法已成功应用于全血样品的铅测定, 结果令人满意。

关键词: 硝酸; 过氧化氢; 石墨炉原子吸收法; 全血; 铅

Determination of Lead in Whole Blood by Graphite Furnace Atomic Absorbance Spectrometry with Nitric Acid-Hydrogen Peroxide Preparation for Protein Removal HUANG Hui-qiu (Pingyang County Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang 325400, China) • The author declares he has no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To establish a novel method for lead determination in whole blood by graphite furnace atomic absorbance spectrometry (GFAAS). [Methods] After the protein in whole blood was removed by 40 mL/L nitric acid mixed with 6 mL/L hydrogen peroxide in a centrifugal separator, lead in whole blood was determined by GFAAS with $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4+\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ as matrix modifier. [Results] Of the current methodological study, the linear range was 10~400 $\mu\text{g/L}$, the detection limit was 4 $\mu\text{g/L}$, the recovery rate range was 87.8%~115.3%, and the relative standard deviation (RSD) was 3.6%~8.6%. [Conclusion] Graphite furnace atomic absorbance spectrometry with nitric acid-hydrogen peroxide deproteinization is satisfied to the purpose of lead determination of whole blood.

Key Words: nitric acid; hydrogen peroxide; graphite furnace atomic absorbance spectrometry; whole blood; lead

血铅的测定方法有石墨炉原子吸收光谱法^[1]、氢化物原子荧光光度法^[2]、微分电位溶出测定法^[3]、同位素稀释多接收电感耦合等离子体质谱法^[4]、示波极谱法^[5]等, 迄今, 前三者采用的较多, 各有优缺点, 后二者应用不多, 其中同位素稀释多接收电感耦合等离子体质谱法是现有测血铅方法中最准确的方法, 但设备昂贵, 较难普及, 而示波极谱法的操作繁琐, 检出限较高^[6], 已少有报道。石墨炉原子吸收光谱仪在很多化学实验室中作为必备仪器, 越来越普及, 因其操作简便、灵敏度高, 一直作为金属痕量检测尤其是血铅分析的首选方法。实践表明, 血铅测定的难点有二: 其一在于校准曲线的基体配制需要的空白血液(人血或牛血)往往不易获得; 其二是血样前处理技术能否达到简便、准确、低污染要求。本研究拟采用硝酸与过氧化氢的混合处理液沉淀血液中蛋白, 降低单一强酸^[7-8]处理液的酸度, 有效地减少对石墨管的损害; 校准曲线不加空白血样, 直接用混合处理液配制, 采用磷酸二氢铵与硝酸镁作基体改进剂, 直接测定上清液中铅, 以实现测定过程简单、步骤少, 不易受污染, 结果理想的愿望。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及条件

AA800 原子吸收分光光计(美国 PE 公司), 带 AS800 石墨炉自动进样器、铅空芯阴极灯、热解涂层平台石墨管; 5430R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司), 配 1.5(或 2) mL 转子; SK-1 快速混匀器(金坛市富华仪器有限公司)。

工作条件: 测定波长 283.3 nm, 空心阴极灯电流 10 mA, 狭缝 0.7 nm, 测定方式为峰面积, 进样体积 20 μL , 基体改进剂 5 μL , 石墨炉升温程序见表 1。

表 1 石墨炉升温程序				
程序	温度(℃)	斜坡时间(s)	保留时间(s)	氩气流量(mL/min)
干燥 1	110	5	30	250
干燥 2	130	15	30	250
灰化	850	15	30	250
原子化	1600	0	5	0
清洗	2450	1	3	250

[作者简介] 黄会秋(1971—), 男, 本科, 副主任技师; 研究方向: 农药残留、金属及金属形态分析; E-mail: hhqq2002@sina.com

[作者单位] 平阳县疾病预防控制中心, 浙江 325400

1.2 主要试剂

铅标准贮备液(1000 mg/L, 国家标准物质中心)、硝酸(UP 级, 苏州晶锐化学有限公司)、过氧化氢(GR 级, 国药集团化

学试剂有限公司)、磷酸二氢铵(GR级,德国Merck公司)、硝酸镁(GR级,德国Merck公司)、硝酸钡(德国Merck公司)、水电导率 $<3\mu\text{S}/\text{cm}$ 。

混合处理液:含40 mL/L硝酸与6 mL/L过氧化氢的水溶液。

铅标准系列使用液:吸取适当铅标准溶液(已用5 mL/L硝酸溶液准确稀释至1.00 mg/L)于100 mL容量瓶中,加入80 mL混合处理液,用水稀释至刻度。

1.3 血样采集与保存

被采集人必须离开作业场所,对采样部位依次用肥皂、清水、稀硝酸(10 mL/L)清洗,酒精消毒后采集静脉血1 mL于真空抗凝塑料管中。血样置冰箱内保存,若一个月内不能分析,需置冷冻室保存备测。

1.4 实验过程

用微量移液器吸取200 μL 血样置于1.5 mL塑料离心管中(经1+9硝酸浸泡、晾干),加入800 μL 混合处理液(“1.2”),漩涡混合1 min,静置20 min,于12 000 r/min(离心半径为9.5 cm)、4℃冷冻温度,离心6 min,吸取上清液上机测定。

2 结果

2.1 样品前处理选择

血液基质复杂,测定血液中的铅元素,其中的有机成分和无机成分都会对测定造成干扰,因此需要适当的样品前处理。目前血铅的前处理,主要有2种方法,即消解(化)法与直接法。前者为湿法消化^[9]、微波消解^[10]与干法灰化^[11],后者为全血稀释^[12]、强酸脱蛋白^[8]等。消解(化)法能较好地去除基体的有机干扰,测的是全血中的铅,但前处理时间较长,操作步骤多,也易受污染,同时由于方法本身的限制,稀释倍数较大,检出限相对较高。直接法中的全血稀释,易导致石墨管积碳严重,精密度不佳。强酸脱蛋白,将血液中的绝大部分有机物沉淀分离,能较好地去除基体的干扰,但较高的酸度会降低石墨管的使用寿命。本研究采用强酸脱蛋白法,但在酸液中加入一定量的过氧化氢,即采用含40 mL/L硝酸与6 mL/L过氧化氢的混合处理液,提取全血中的铅。实验结果表明,既不影响血液中蛋白和沉淀,又降低了上机液的酸度,效果良好。

2.2 处理液的组成确定

2.2.1 过氧化氢含量 分别用含2、4、6、8、10、12 mL/L过氧化氢(按100%折算)的水溶液,按“1.4”操作,结果表明, $\geq 8\text{ mL/L}$ 的过氧化氢添加量,因反应过于激烈,处理液直接溢出离心管。综合考虑过氧化氢的氧化能力,实验选择6 mL/L的过氧化氢。

2.2.2 硝酸含量 分别用含10、20、30、40、50、60、80、100 mL/L硝酸与6 mL/L的过氧化氢的混合处理液,按“1.4”操作,结果表明,10~30 mL/L的硝酸含量未能有效地脱除血液蛋白, $\geq 40\text{ mL/L}$ 的硝酸含量,酸层未见红色,澄清透明,脱蛋白效果显著。考虑到酸度过高,影响石墨管使用寿命,实验选择40 mL/L的硝酸含量。进一步的实验表明,如单纯用硝酸溶液,则其等效脱蛋白浓度为 $\geq 50\text{ mL/L}$,可见过氧化氢的加入,降低了处理液的最低酸度。

2.3 基体改进剂的确定

2.3.1 基体改进剂的选择 测铅常用的基体改进剂硝酸钡价格昂贵,溶液保存期短(常会有沉淀析出),自动进样针的塑料管硬化较快,在以峰高为定量方法时,灵敏度也不如磷酸二氢铵,因此,方法选择磷酸二氢铵+硝酸镁作为基体改进剂。

2.3.2 磷酸二氢铵、硝酸镁的浓度 实验中发现,与单独使用磷酸二氢铵相比,硝酸镁的加入,不改变峰高与峰面积,但能提高原子化温度(表现为原子化条件相同时,元素峰出峰时间延迟)。因此先配制10、20、30、50、100 g/L磷酸二氢铵溶液,按“1.1”工作条件测定50 $\mu\text{g/L}$ 铅标准使用液(“1.2”),实验表明30 g/L的磷酸二氢铵,峰高最高;然后分别配制含0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 g/L硝酸镁与30 g/L的磷酸二氢铵溶液,按“1.1”工作条件测定50 $\mu\text{g/L}$ 铅标准使用液(“1.2”),结果表明以1.0~1.5 g/L硝酸镁的铅峰高最高。因此,该方法确定磷酸二氢铵和硝酸镁的浓度分别为30 g/L、1.0 g/L。

2.4 原子化条件

该方法在仪器推荐的铅元素测定条件[以磷酸二氢铵(50 μg)+硝酸镁(3 μg)为基体改进剂]下,作了适当改进:(1)延长斜坡时间,以降低干燥与灰化的斜坡升温速率;(2)增长干燥与灰化的保留时间,以防止“暴沸”与降低背景。实验最后选定的原子化条件如表1所示,实验过程未发现干燥与灰化过程的“暴沸”现象,原子化出峰时间为1 s,在合理期间内(0.5 s~1.5 s)^[13]。

2.5 线性方程与检出限

根据“1.1”的测定条件,测定按“1.2”配制的标准系列:0、2、5、10、20、30、50、80 $\mu\text{g/L}$,测定铅峰面积,经回归处理得到线性方程 $C=0.00201S+0.0014$ (C :标液浓度, S :峰面积),相关系数 $r=0.999\ 2$,方法线性范围10~400 $\mu\text{g/L}$ (上机液线性范围2~80 $\mu\text{g/L}$)。连续测定试剂空白吸光值20次,3倍空白溶液吸光值的标准偏差除以方法曲线斜率,得出上机液检出限为0.8 $\mu\text{g/L}$,折算为方法检出限为:4 $\mu\text{g/L}$ 。

2.6 回收率与精密度试验

选取三个不同浓度水平的血液样品,按本法测试,分别平行测定6次,考查方法精密度,相对标准偏差RSD为3.6%~8.6%(表2)。

表2 精密度试验

样品序号	6次测定值($\mu\text{g/L}$)						RSD(%)
1	13.4	15.1	12.5	15.9	13.8	14.5	8.6
2	64.3	67.9	66.1	70.3	65.9	70.1	3.6
3	168	174	169	170	166	183	3.6

同样选取上述三份样品,大致各按其0.5、1、2倍添加铅标液,做回收率试验,回收率在87.8%~115.3%之间(表3)。

2.7 质控样测定

取冻干牛血铅标准质控样品,按方法测定,结果均在定值范围内(表4)。

表 3 回收率试验

样品序号	本底值(μg/L)	加标量(μg/L)	测得值(μg/L)	回收率(%)
1	14.2	7.5	22.4	109.3
		15.0	28.5	95.3
		30.0	42.9	95.7
2	67.4	30.0	102	115.3
		60.0	129	102.7
		120	182	95.5
3	172	90	251	87.8
		180	366	107.8
		350	507	95.7

表 4 质控试验

国标编号	标准值(μg/L)	测定值(μg/L)
GBW09139	111 ± 15	117
GBW09140	357 ± 12	366

3 讨论

血样经添加混合处理液后,脱去的蛋白经高速离心,沉淀于离心管底部,直接用石墨炉原子吸收仪测定上清液中的铅,样品不需消化,步骤少,不易受污染,简便快速;混合处理液的酸度因过氧化氢的加入而有适当的降低,有利于延长石墨管的使用寿命;标准(校准)曲线不需添加空白血液作基质,这些都较标准^[7]与目前大多同行采用的石墨炉测血铅方法更为简化,方便,且优化后的原子化条件使得方法精密度良好,结果准确可靠,适用于健康人群和职业接触者血铅的测定。

方法的不足之处在于,上机液的酸度仍较仪器公司推荐的硝酸含量偏高,对石墨管可能有一定的损害,这是强酸脱蛋白的一个最主要的缺点,也是将来需要努力克服的。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1]陈晓红,于笑宇. Zeeman-石墨炉原子吸收测定全血中微量铅[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(3): 477-478.

[2]麦洁梅,成晓玲,张琪. 氢化物发生-原子荧光光谱法测定全血中铅的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(8): 1416-1418.

[3]赵海玲,邱宏萌,雷琼,等. 微分电位溶出法测定血中的铅[J]. 实验与检验医学, 2008 26(5): 561-562.

[4]王琛,赵永刚,王同兴,等. 同位素稀释多接收电感耦合等离子体质谱法测定血铅[J]. 质谱学报, 2008, 29(2): 84-87.

[5]冯俊华,余远碧,黎超. 示波极谱法测定全血和尿样中铅[J]. 理化检验: 化学分册, 1999, 35(2): 82-84.

[6]中华人民共和国卫生部. WS/T 108—1999 血中铅的示波极谱测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[7]中华人民共和国卫生部. WS/T 174—1999 血中铅镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999.

[8]张宜明,俞锡林,丁华. 全血铅测定的前处理优化与质控检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(2): 250-251.

[9]杨巧珍. 恒温消解石墨炉原子吸收法测定微量血液中的铅和镉[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2010, 12(259): 176.

[10]黄树梁. 微波消解—原子吸收法测定全血中铁锌钙镁铜铅镉[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(7): 250-251.

[11]蒋炜,唐洪,刘中春,等. 干法灰化石墨炉原子吸收光谱法测定全血铅[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(3): 464-465.

[12]陈宇鸿,沈仁富. 石墨炉原子吸收光谱法直接测定血中铅[J]. 环境与职业医学, 2011, 28(8): 499-500.

[13]张扬祖. 原子吸收光谱分析应用基础[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2007: 138.

(收稿日期: 2012-10-30)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郭薇薇; 校对: 徐新春)

【告知栏】

首届职业卫生与应急救援论坛会议通知

为做好职业卫生与应急救援工作,进一步推动职业安全健康与社会经济的和谐发展,由上海市职业安全健康研究院、上海市化工职业病防治院主办,《职业卫生与应急救援》杂志编委会协办的“首届职业卫生与应急救援论坛”会议,拟于2013年8月26日—8月28日在第四届中国(上海)国际劳动保护与安全装备展览会期间召开。会议同时举办国家继续医学教育项目“跨部门突发化学中毒事件应急处置及救援模式探讨”培训班(项目编号: 2013-12-01-051)。凡参加培训并通过结业考核者,均可获I类学分10分。

论坛主题: 完善化学中毒应急救援机制。主要交流内容: (1)应急救援体制机制建设; (2)化学事故风险评估; (3)群发性中毒的处置; (4)事故应急处置设备与技术; (5)急性中毒灼伤治疗经验; (6)应急救援补偿机制探讨等。会议地点: 上海世博展览馆三号馆(浦东新区国展路1099号)。会议费用: 600元/人(含餐费)。会议统一安排住宿,住宿费用自理。联系方式: 电话: 021-54894373; 联系人: 张老师,陈老师; 传真: 021-54894374; E-mail: zyws@chinajournal.net.cn。

欢迎各位同行积极报名与会交流。交流论文可以word附件形式向《职业卫生与应急救援》杂志投稿,投稿邮箱: zyws@chinajournal.net.cn(注明“会议征文”字样),文章将择优发表,截稿日期为2013年8月20日。