

响应面法优化石墨炉原子吸收光谱法直接测定小鼠全血铅

冯乐, 林跃, 李珊, 徐英, 杨冰仪, 王梅

摘要: [目的] 探讨响应面法优化石墨炉原子吸收光谱法直接测定全血中铅。[方法] 以 0.5% Triton X-100 溶液做血液稀释剂, 0.05% 氧化钼 + 0.1% 硝酸混合溶液为基体改进剂, 直接进样测定。在单因素的基础上, 采用中心组合设计和响应面分析法优化灰化温度、原子化温度和基体改进剂用量等因素, 并在优化条件下测定小鼠全血铅结果。[结果] 响应面法优化石墨炉原子吸收光谱法直接测定小鼠全血铅的最优测定条件为灰化温度 760.85℃, 原子化温度 2486.80℃, 基体改进剂加入量 0.97 mL。在已优化的条件下测定铅的检出限为 0.204 μg/L, 相对标准差 ($n=6$) 为 1.76%。染毒小鼠的全血铅含量为 82.1 μg/L, 加标回收率为 96.5%~98.4%。[结论] 响应面法优化石墨炉原子吸收光谱法不需消化和离心, 直接进样, 简便快速和准确, 适用于染毒小鼠全血铅的测定。

关键词: 铅; 石墨炉原子吸收; 基体改进剂; 响应面法

Direct Determination of Lead in Mouse Blood by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Optimized by Response Surface Methodology FENG Le, LIN Yue, LI Shan, XU Ying, YANG Bing-yi, WANG Mei (Guangdong Key Laboratory of Molecular Epidemiology/School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong 510310, China). Address correspondence to WANG Mei, E-mail: wmei02@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore a method for direct determination of lead in mouse blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) with optimization using response surface methodology. [Methods] After blood samples were diluted with 0.5% Triton X-100 solution, lead in blood was directly determined by GFAAS using a mixture solution of 0.05% PdCl₂ and 0.1% HNO₃ as modifier. The effects of matrix modifier dosage, ashing temperature, and atomization temperature on absorbance were examined by central composite design and response surface methodology. [Results] The optimum extraction conditions were as follows: ashing temperature, 760.85℃; atomization temperature, 2486.80℃; and dosage of matrix modifier, 0.97 mL. Under the optimal conditions, the value of detection limit for Pb was 0.204 μg/L, and the relative standard deviation (RSD) for six replicate determinations of Pb was 1.76%. Lead in blood of mice was successfully detected at a concentration of 82.1 μg/L, and the recoveries were 96.5%~98.4%. [Conclusion] The method is simple, rapid, and accurate by direct injection without digestion or centrifugation, which can be applied to lead determination in mouse blood.

Key Words: lead; graphite furnace atomic absorption spectrometry; matrix modifier; response surface methodology

铅是环境中常见的重金属污染物。铅及其化合物进入人体后, 可存留于红细胞中并与血红蛋白结合, 逐渐转移到肺、肝、肾等器官中引起人体损伤^[1-2]。血液中铅含量是近期铅接触和急性铅中毒的指标^[3]。血铅测定通常采用石墨炉原子吸收法 (GF-AAS)^[4-5], 区别主要在于血液是否要离心处理以及为消除

干扰使用的不同基体改进剂, 血样离心较繁琐, 在实验条件的选择上通常采用单因素和正交实验^[6-8]。单因素实验忽略了因素之间的交互作用且费时, 而正交实验存在只能处理离散水平值的缺点。响应面分析法 (response surface methodology) 是一种优化多变量系统的有效试验工具, 研究因素与响应值以及因素之间相互关系, 通过对二次回归方程分析找到最优值和整个区域上的最佳因素组合^[9-10]。本研究使用 0.5% 曲拉通 (Triton) X-100 做血液稀释剂, 0.05% 氧化钼 (PdCl₂) + 0.1% 硝酸 (HNO₃) 混合溶液为基体改进剂, 首次利用中心组合设计和响应面分析法探讨灰化温度、原子化温度和基体改进剂用量对石墨炉原子吸收测定条件的影响, 以达到在最优条件下直接测定小鼠全血铅的目的。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

Z-2000 型原子吸收分光光度计 (日本日立公司); SZ-97 自

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0132

[基金项目] 广东省高等院校学科建设和教学质量与教学改革工程专项项目“预防医学应用型人才培养模式创新实验区”(编号: 粤财教[2011]473号); “广东省预防医学专业综合改革试点项目”和“预防医学人才协同创新培养模式探索与实践”(编号: 粤高教函[2013]113号)

[作者简介] 冯乐 (1991—), 女, 本科生; 研究方向: 公共卫生与预防医学; E-mail: fengleandy31@qq.com

[通信作者] 王梅, E-mail: wmei02@163.com

[作者单位] 广东药学院公共卫生学院, 广东省分子流行病学重点实验室, 广东 510310

动三重水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂); BT-224S 万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器)。铅(核工业北京化工冶金研究所, 1000mg/mL)标准储备液: 使用时以 3 次蒸馏水逐步稀释; 0.5% Triton X-100 水溶液; 0.05% PdCl₂+0.1% HNO₃ 混合溶液。实验用试剂均为优级纯或分析纯; 实验用水为 3 次石英亚沸蒸馏水; 实验用玻璃仪器均用质量分数 10% 硝酸浸泡 24 h, 再用 1 次水及 3 次蒸馏水洗净。

1.2 仪器工作条件

铅的测定波长为 283.3 nm, 灯电流均为 7.5 mA, 光谱通带宽度为 1.3 nm, 样品和标准进样量为 20 μL, 峰高定量, 石墨炉升温程序见表 1。

表 1 石墨炉升温程序

步骤	开始温度 (℃)	终点温度 (℃)	斜坡时间 (s)	保持时间 (s)	气体流量 (L/min)
干燥	80	140	40	0	200
灰化	400	400	20	0	200
原子化	2020	2020	0	5	30
清除	2200	2200	0	4	200

1.3 样品制备

染毒小鼠摘眼球取血 2mL, 按照 9:1 比例加入 3.8% 柠檬酸钠抗凝剂 0.22mL, 混匀。取混匀血样 1mL, 0.05% PdCl₂+0.1% HNO₃ 混合溶液加入量按照实验条件加入, 用 0.5% Triton X-100 溶液定容至 5mL, 摇匀备用, 同时做试剂空白。

1.4 单因素试验

实验对 Triton X-100 用量、基体改进剂种类和用量、灰化和原子化温度进行单因素试验, 考察各因素对光密度的影响。

Triton X-100 为血液稀释剂, 可降低血液的表面张力, 实现直接进样。但 Triton X-100 是一种非离子表面活性剂, 在干燥、灰化阶段易产生起泡现象, 严重时样品会溢出石墨管, 给测定带来困扰。因此需控制 Triton X-100 的浓度, 使之既可降低血液黏稠度, 又不致起泡。

血样含有丰富的有机质和微量元素, 特别是有较高浓度的氯化物, 会严重影响 Pb 的测定。实验分别考察了基体改进剂磷酸二氢铵(NH₄H₂PO₄)、磷酸二氢铵-硝酸镁[NH₄H₂PO₄-Mg(NO₃)₂]和 0.05% PdCl₂+0.1% HNO₃ 混合溶液对光密度的影响。

1.5 中心组合实验设计

在单因素试验基础上, 以光密度为考察指标, 选取对光密度有显著影响的三个因素——灰化温度、原子化温度和基体改进剂用量, 进行中心组合设计试验。各因素及水平见表 2。

表 2 中心组合设计因素及水平

变量	因素	水平				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
X ₁	灰化温度(℃)	581	650	750	850	919
X ₂	原子化温度(℃)	2231	2300	2400	2500	2569
X ₃	基体改进剂用量(mL)	0.16	0.5	1.0	1.5	1.8

1.6 统计学分析

采用 SAS 9.1 软件对试验结果进行响应面分析, 建立数学

模型和优化试验条件。

2 结果

2.1 单因素试验

结果表明, Triton X-100 体积分数以控制在 0.2%~0.4% 为宜, 本实验选择 Triton X-100 体积分数为 0.3%。0.05% PdCl₂+0.1% HNO₃ 混合溶液光密度最大, 光谱图峰形尖锐, 且耐受的灰化温度和原子化温度亦最高, 实验效果最好。铅灰化温度为 650℃ 可消除基体和稀释剂 Triton X-100 干扰, 特别是在低于 550℃ Triton X-100 干扰特别严重, 出现双光谱现象, 灰化温度为 750℃, 光密度最大。

2.2 中心组合设计试验

对表 3 试验数据进行多元回归拟合, 得到光密度(D)对灰化温度(X₁)、原子化温度(X₂)和基体改进剂用量(X₃)的二次多项回归方程为: $D[(\times 10^{-4})] = -75.066 + 10.5 X_1 + 55.21 X_2 + 11.643.9 X_3 - 6.3 \times 10^{-3} X_1^2 - 0.9 X_1 X_3 - 1.1 \times 10^{-2} X_2^2 - 3.1 X_2 X_3 - 1751.0 X_3^2$ 。

表 3 中心组合设计试验结果

实验号	灰化温度水平	原子化温度水平	基体改进剂用量水平	光密度值
1	-1	-1	-1	0.2098
2	-1	-1	1	0.2611
3	-1	1	-1	0.2734
4	-1	1	1	0.2678
5	1	-1	-1	0.2199
6	1	-1	1	0.2579
7	1	1	-1	0.2841
8	1	1	1	0.2568
9	-1.682	0	0	0.2934
10	1.682	0	0	0.3044
11	0	-1.682	0	0.2564
12	0	1.682	0	0.3174
13	0	0	-1.682	0.1784
14	0	0	1.682	0.2072
15	0	0	0	0.3150
16	0	0	0	0.3172
17	0	0	0	0.3199
18	0	0	0	0.3145
19	0	0	0	0.3193
20	0	0	0	0.3141
21	0	0	0	0.3125
22	0	0	0	0.3125
23	0	0	0	0.3124

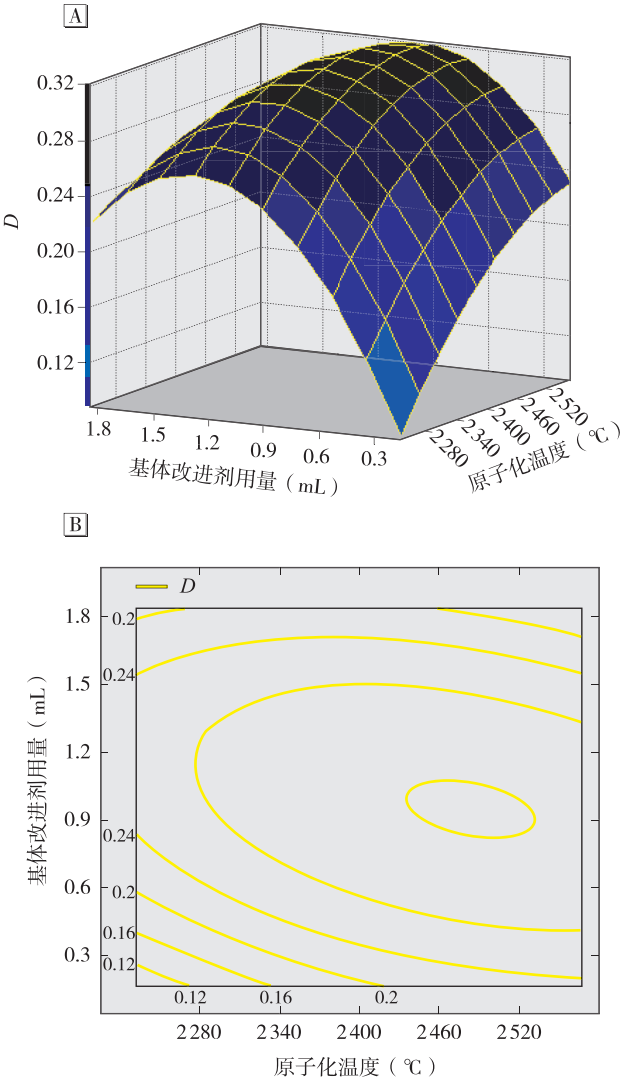
响应面实验回归分析结果见表 4。表中可知, 在一次项的回归分析中, 原子化温度、基体改进剂用量及灰化温度对光密度有影响($P < 0.05$); 三因素的二次项影响有统计学意义($P < 0.001$); 基体改进剂用量与灰化温度和原子化温度存在交互作用, 其中与灰化温度的交互作用 $P < 0.05$ 。回归模型的方差分析结果显示, 模型 P 值为 0.0001, 小于 0.05, 表明回归模型有统计学意义; 失拟项 $P > 0.05$, 表明该回归方程无失拟因素存在, 回归方程与实测值能较好的拟合; 决定系数 $R^2 = 0.9968$ 。

表 4 响应面实验回归分析结果

变量	估计值	标准误	t	P
X_1	1.84×10^{-3}	8.47×10^{-4}	2.17	0.049
X_2	1.73×10^{-2}	8.47×10^{-4}	20.41	<0.001
X_3	7.68×10^{-3}	8.47×10^{-4}	9.07	<0.001
$X_1 \times X_1$	-6.26×10^{-3}	7.85×10^{-4}	-7.98	<0.001
$X_1 \times X_2$	-9.00×10^{-4}	1.11×10^{-3}	-0.81	0.430
$X_1 \times X_3$	-4.38×10^{-3}	1.11×10^{-3}	-3.96	0.002
$X_2 \times X_2$	-1.06×10^{-2}	7.85×10^{-4}	-13.39	<0.001
$X_2 \times X_3$	-1.53×10^{-2}	1.11×10^{-3}	-13.81	<0.001
$X_3 \times X_3$	-4.38×10^{-2}	7.85×10^{-4}	-17.13	<0.001

2.3 响应面分析与优化

根据上述回归方程,运用SAS 9.1 软件作出响应曲面和等高线图。灰化温度与原子化温度的响应面坡度较平缓,等高线稀疏且呈圆形,交互作用不显著;基体改进剂用量与灰化温度、原子化温度的响应面坡度陡峭,等高线密集,呈椭圆形,交互作用显著,特别是与原子化温度交互作用更为显著,见图1。光密度值对于基体改进剂用量改变敏感,同回归分析结果相一致。



[注]A: 响应面图; B: 等高线图。

图 1 原子化温度和基体改进剂用量交互作用对光密度(D)值影响

优化分析得到最佳测定条件为:灰化温度 760.85℃,原子化温度 2486.80℃,基体改进剂加入量 0.97 mL。考虑到实际操作的可行性,将测定条件修正为:灰化温度 760℃,原子化温度 2490℃,基体改进剂加入量 0.97 mL。采用此测定条件进行验证实验,理论预测值与实测值仅有 1.6% 的差别。

2.4 工作曲线、精密度实验和方法检出限

铅标准曲线在 1.00~80.0 μg/L 之间呈线性相关,回归方程为 $y=0.0044C-0.0001$, 决定系数 $R^2=0.9984$ 。

平行测定 40 μg/L 铅标准溶液 6 次,相对标准偏差分别为 1.76%,方法精密度符合要求。

对试剂空白进行 6 次测定,计算测定光密度的标准偏差以 3 倍标准偏差除以工作曲线的斜率,得铅的检出限为 0.204 μg/L。

2.5 样品测定和回收率实验

以所建立的方法测定染毒小鼠血铅含量,并进行加标回收实验,按照血铅含量的 50% 和 100% 加标,平行测定 3 次。测得血铅含量为 82.1 μg/L,回收率为 96.5%~98.4%。

表 5 小鼠血液分析及加标回收率 (n=3)

标准加入量 (μg/L)	平均测得值 (μg/L)	回收率 (%)
—	82.1	—
40	120.7	96.5
80	160.8	98.4

3 讨论

石墨炉法测定血铅,是目前公认的一种比较可靠的办法。由于血液较黏稠,给进样测定带来不便,需加入稀释剂。且血液成分较复杂,特别是有较高浓度的氯化物,严重影响 Pb 的测定,需要添加基体改进剂以提高灰化温度,降低背景干扰。血液稀释剂有文献报道采用 HNO₃、H₃PO₄ 和 Triton X-100, HNO₃、H₃PO₄ 比较耗费石墨管。而 Triton X-100 作为一种非离子表面活性剂,可有效的降低血液的表面张力,实验中 Triton X-100 体积分数控制在 0.2%~0.4% 为宜,否则在干燥、灰化阶段会起泡。

本实验首次采用中心组合设计和响应面分析法优化对光密度有明显影响的三个因素——灰化温度、原子化温度和基体改进剂用量,回归方程的决定系数 $R^2=0.9968$,说明模型具有较好的拟合度,实验误差小,可以用该模型代替实验真实点对实验结果进行分析。采用优化的实验条件进行验证实验,理论预测值与实测值仅有 1.6% 的差别,从另外一个方面也表明二次回归模型是合理的,测定条件准确可靠,具有实际应用价值。灰化温度、原子化温度和基体改进剂用量等 3 个因素的一次项、二次项以及基体改进剂用量分别与灰化温度、原子化温度交互项影响明显。基体改进剂用量对光密度值有较大影响,这与铅的原子化温度不高、血液成分中的有机质和微量元素特别是氯化物、基体干扰严重有关。

石墨炉原子吸收法直接测定小鼠全血铅,前处理简单,基体改进剂 0.05%PdCl₂+0.1%HNO₃ 混合溶液的加入使干扰大大降低。血样经 0.5% Triton X-100 溶液稀释后,直接进样测定,不需消化和离心,方法污染小、简便快速和准确,适合大批量样品的检测。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] MARANHÃO TA, MARTENDAL E, BORGES DLG, et al. Cloud point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multivariate optimization using Box-Behnken design[J]. Spectrochimica Acta Part B, 2007, 62: 1019-1027.
- [2] 王林, 陈大伟, 曹瑾, 等. 铅镉联合暴露对大鼠肾脏功能损伤的研究[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(5): 345-348.
- [3] 曾静, 闫赖赖, 欧阳荔, 等. 铅染毒大鼠血、毛发及组织脏器铅指纹差异现象[J]. 中国科学, 2012, 57(2/3): 138-143.
- [4] 王梅, 杨冰仪, 刘秋芳, 等. 浊点萃取-石墨炉原子吸收光谱法同时测定生物样品中痕量铅和镉[J]. 分析实验室, 2013, 26(1): 56-58.
- [5] 白国银, 王淳阅, 李丽丽, 等. 石墨炉原子吸收光谱法测定血铅方法的改进[J]. 环境与职业医学, 2013, 30(9): 720-722.
- [6] 吴库生, 郭勇勇, 徐锡金, 等. 正交实验设计优化石墨炉原子吸收法实验条件测定脐带血铅[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 302-303.
- [7] 王先良, 王小利, 张金良. 用石墨炉原子吸收光谱法测定血清镉[J]. 光谱实验室, 2008, 25(5): 854-857.
- [8] 孙湛, 张瑛, 于志刚, 等. 3种血铅检测方法比较[J]. 中国职业医学, 2013, 40(1): 73-74.
- [9] 金达明, 吴俊, 赵岩, 等. 中心组合设计-响应面分析法优选人参中总皂苷的超声提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(9): 2148-2150.
- [10] PAWAR YB, PUROHIT H, VALICHERLA GR. Novel lipid based oral formulation of curcumin: development and optimization by design of experiments approach[J]. Int J Pharm, 2012, 436(1/2): 617-623.

(收稿日期: 2013-11-15)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 洪琪)

(上接第 556 页)

境权,其次要最大限度的拓宽公众参与的途径,对合理的诉求要认真采纳,不能采纳的,要做好细致的解释工作,必要时要召开各种形式的听证会,接受公众的质询。

同时,对于合法建设的电磁项目需加以保护,不能因为抵制不住群众投诉、上访或舆论压力,就被迫停建建设或使用单位、甚至拆除相关设施,这种做法极易造成群众的仿效。如果矛盾激化以致无法协调,环保部门则必须积极引入司法介入,出具科学、合理的鉴定意见,协助企业积极应诉,保护其合法权益不受到侵害。

3.3 掌握详实现状,强化环境管理

目前环保部门对城市电磁环境质量现状以及电磁污染源的品种、数量和分布尚不清晰,致使电磁辐射源管理的复杂性在所难免。首先,有必要建立动态的电磁污染源数据库,掌握城市电磁辐射本底值,摸清当前电磁污染源的基数;同时,要积极推进电磁环境功能区划,在电磁环境敏感区、人口居住密集区设立长期的连续监测点位,建立电磁环境年度报告,保障公众健康^[5]。

电磁环境的改善和管理需要各界的积极配合和参与。环保部门可牵头做好电力、移动通讯等行业与社会公众之间的沟通工作,如有新建或改建的电力设施、基站等,可以主动与地方主流媒体进行对接,及时、详实的提供信息,使媒体能够正面、客观和科学地向相关公众进行情况通报,将消极的负面影响消除于萌芽状态,这也是加强环境管理不可或缺的一环之一。

3.4 合理规划建设,加大科普宣传

建立环保与规划、建设等相关部门的联动机制,将电磁环境因素纳入城市建设的总体规划中,综合考虑电磁类项目的发展布局以及城市电磁环境容量之间的关系,在项目设计、施工、要考虑公众的心理、感官等方面的因素。一是尽量避开电磁环境敏感区,如学校、幼儿园、医院等,以及避免与居民区之间的交叉影响,以提高项目选址的合理性;二是针对输电线路应尽可能抬高线高、优化相序排列,针对不同运营商应考虑建立公共基站,以减少基站数量并降低天线增益,最大

化的减少电磁污染影响。

WHO 针对全球共同关心的电磁场环境健康风险,利用 10 年时间开展“国际电磁场计划”研究,得出以下结论:“没有足够和可信的证据可供作出以下结论:长期暴露于社会公众和职业环境现有水平的电场和磁场对人体健康是有害的或者会引起包括癌症在内的疾病”,“总体权衡,与儿童期白血病有关的证据不足以认定为存在因果关系”。也就是说,公众常见的低频电场、磁场和电磁场,不会引起对生物分子(包括 DNA)的直接伤害;即使是存在关联,对公众健康的影响也极其有限。

所以,不分频率的笼统的使用“电磁辐射”概念,极易引起公众的疑虑。为消除恐慌、防止纠纷发生,环保部门应积极采纳国际标准,开展电磁知识宣传工作,正确理解生活中人为电场、磁场及电磁场的来源及其实践的正当性、安全性,掌握降低居室电磁场的方法或防护方法。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 张琦, 张华英. 电磁辐射环境污染现状及防治对策研究[J]. 硅谷, 2008(16): 102.
- [2] 管登高, 孙传敏, 孙遥, 等. 电磁辐射污染与电磁辐射环境保护[C] // 武汉大学, 美国 James Madison 大学. Proceedings of International Conference on Engineering and Business Management (EBM2010). 美国: 美国科研出版社, 2010: 4.
- [3] 邱秋. 我国电磁辐射污染防治的法律对策[J]. 环境与职业医学, 2007, 24(3): 359-360.
- [4] 郭祖美. 城市电磁环境影响分析及污染防治对策[J]. 广东科技, 2012(2): 49; 62.
- [5] 孙遥, 徐冠立, 管登高, 等. 城市电磁环境污染及其防治对策[J]. 电讯技术, 2012, 52(4): 604-608.

(收稿日期: 2013-10-22)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 汪源)