

石墨炉原子吸收法测定全血标本铅含量的 3 种前处理方法

张斯恩, 张贝基, 谭红丽[△] (云南省第三人民医院医学检验科, 昆明 650011)

【摘要】 目的 比较石墨炉原子吸收法测定全血标本中铅的 3 种前处理方法优劣, 从中筛选一种更简便、准确、灵敏的方法, 从而达到提高检测质量, 降低工作强度的目的。**方法** 采用酸脱蛋白法、混合基体改进剂法、微波消解法对无铅接触史的健康成年人全血标本进行前处理, 分别用石墨炉原子吸收法检测, 对检测结果进行统计分析, 比较标准曲线线性、相关系数(r)、相对标准偏差($RSD\%$)、准确度等指标。**结果** 3 种方法标准曲线 r 分别为 0.996 5、0.994 2、0.999 5; 检出限分别为 5.4、3.6、2.7 $\mu\text{g/L}$; $RSD\%$ 分别为 4.1、4.5、2.8; 回收率分别为 95.7%~103.3%、98.7%~104.5%、98.3%~102.3%。**结论** 微波消解处理全血标本各项指标均令人满意, 是测量血铅较好的前处理方法。

【关键词】 血铅; 酸脱蛋白法; 基体改进剂; 微波消解; 石墨炉原子吸收法

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.13.015 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)13-1778-03

Comparison of three specimen pretreatment methods for measuring lead content in whole blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry ZHANG Si-en, ZHANG Bei-ji, TAN Hong-li[△] (Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650011, China)

【Abstract】 Objective To compare three specimen pretreatment methods for measuring lead content in whole blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Methods** Whole blood of healthy adults without lead exposure history were pretreated by using acid deproteinized method, mixed matrix modifier method, and microwave digestion method, and then detected for lead content by using graphite furnace atomic absorption spectrometry. All results were statistically analyzed to compare indicators, including standard curve's linear, correlation coefficient, relative standard deviation ($RSD\%$), accuracy and so on. **Results** Correlation coefficients of standard curve of the three methods were 0.996 5, 0.994 2 and 0.999 5, the minimum detectable concentration were 5.4, 3.6 and 2.7 $\mu\text{g/L}$, $RSD\%$ were 4.1, 4.5 and 2.8, and the recovery rates were 95.7%—103.3%, 98.7%—104.5% and 98.3%—102.3%. **Conclusion** The evaluation indicators of microwave digestion method could be satisfactory, which might be an ideal method for pretreatment of blood specimens for detection of lead content.

【Key words】 blood lead; acid deproteinized method; mixed matrix modifier method; microwave digestion; graphite furnace atomic absorption spectrometry

铅是一种常见的环境污染物, 随着工业应用、矿山开采等人类活动, 铅及铅的各种化合物日益广泛分布于人们生存的环境中。血铅作为一项衡量人体铅暴露水平的指标也很早就受到人们的重视^[1]。检测血铅的方法有很多, 诸如原子吸收法、质谱法、微分电位溶出法、原子荧光法等, 这些方法各有优劣。我国血铅检测国标采用的方法是石墨炉原子吸收法^[2]。全血中基质成分复杂, 对检测结果的稳定性及准确性造成极大影响。为了减少基体干扰, 检测人员往往采用样本消解、加基体改进剂或萃取分离等多种措施^[3-4]。通过查阅文献, 目前研究较多, 被较多实验室采用的样本前处理方法主要有 3 种: 一是根据国标 WS/T 174-1999《血中铅、镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法》进行的酸脱蛋白, 取上清液离心检测; 二是采用 0.1% 氯化钯(PdCl_2) + 0.5% 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) + 0.1% 硝酸(HNO_3) 混合液作为基体改进剂对血样进行稀释后直接进样检测^[5]; 三是采用微波消解仪对全血样本进行彻底消解, 去除基质干扰后用去离子水稀释定容, 进样检测^[6]。为了方便检测人员选择合适的标本前处理方法, 本文就上述方

法进行了一系列指标的横向比较, 现将实验成果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 岛津 AA-6300C 原子吸收分光光度计, 带石墨炉原子化器 (日本岛津公司); Multiwave 3000 微波消解仪 [安东帕 (中国) 有限公司]; BHW-09A 型恒温消解仪; VORTEX GENIUS 3 漩涡混匀器; 铅空心阴极灯 (北京有色金属总院); 平台石墨管 (日本岛津公司)。

1.1.2 试剂 铅标准溶液 (中国计量科学研究院); 硝酸 (优级纯) [重庆川东化工 (集团) 有限公司]; PdCl_2 (分析纯) (国药集团化学试剂有限公司); Triton X-100 (优级纯) (国药集团化学试剂有限公司); 30% 过氧化氢 (H_2O_2) (优级纯) (国药集团化学试剂有限公司); 试验用水均达到实验室用水规格 GB6682-2000 一级水标准^[7]; 牛全血; 健康人血。

1.2 仪器工作条件 原子吸收分光光度计工作参数: 元素灯为铅空心阴极灯, 波长 283.3 nm, 灯电流 8 mA, 狭缝宽 0.7 nm, 点灯方式为 BCG-D2, 进样体积为 10 μL 。石墨炉升温程

序见表 1。微波消解仪工作条件见表 2。

表 1 石墨炉升温程序

阶段	温度(℃)	时间(s)	加热方式	气体流量(L/min)
1(干燥)	80	15	斜坡升温	0.2
2(干燥)	140	20	斜坡升温	0.2
3(干燥)	200	20	斜坡升温	0.2
4(灰化)	500	20	瞬间升温	0.2
5(原子化)	2 500	6	瞬间升温	0.0
6(清洁)	2 800	3	瞬间升温	1.0

注:采样阶段号为 5。

表 2 微波消解仪工作条件

阶段	功率(W)	时间(min)
功率爬坡	700	10
功率保持	700	5
功率爬坡	1 100	10
功率保持	1 100	15
冷却	0	15

1.3 方法

1.3.1 制备标准曲线 3 种前处理方法制备标准曲线的步骤分别为:(1)酸脱蛋白法。取 5 只容积为 1.5 mL 的离心管,每只加入牛全血 1 mL,分别吸出 0、50、100、150、200 μL 弃去,再分别加入与弃去体积相同体积的质量浓度为 1 000 μg/L 的铅标准溶液,充分混匀后即配成浓度分别为 0、50、100、150、200 μg/L 的加标血样。将各浓度加标血样分别吸出 150 μL,加入 5 mL 一次性使用塑料试管内,固定在漩涡混匀器上,以 4 档速度匀速振荡,准确加入 600 μL 5% HNO₃,混匀 30 s,静置 10 min 后放入高速离心机内以 15 000 r/s 速度离心 5 min。取上清液于样品杯中,测定吸光度值绘制标准曲线。(2)混合基体改进剂法。加标血样制作方法同酸脱蛋白法,将各浓度加标血样分别吸出 150 μL,加入 600 μL 事先配置好的浓度为 0.1% PdCl₂+0.5% Triton X-100+0.1% HNO₃ 的混合基体改进剂中,充分振摇均匀,分别置于样品杯中,测定吸光度值绘制标准曲线。(3)微波消解法。将质量浓度为 1 000 μg/L 铅标准溶液用 1% HNO₃ 稀释成浓度分别为 0、50、100、150、200 μg/L 的铅溶液,将各浓度铅溶液分别吸出 150 μL,加入 600 μL 体积分数为 1% 的 HNO₃ 中,充分振摇均匀,分别置于样品杯中,测定吸光度值绘制标准曲线。

1.3.2 样品处理 酸脱蛋白法及混合基体改进剂法的样品处理方式与其配制标准曲线时对加标血样的处理方式完全相同。微波消解法:精确吸取 1 mL 血样加入微波消解反应管内,再加入 4 mL 浓硝酸及 1 ml 30% H₂O₂,混匀后放入外套管内旋紧顶盖,置于微波消解仪内消解。消解完成后取出反应管,在恒温消解仪上 150 ℃赶酸至仅剩 0.5~1.0 mL,转移至 10 mL 比色管内,用超纯水定容,同时做空白对照。

1.3.3 *r* 检出限(DL)计算方法 DL 计算公式:DL=3×*s*/K。*s* 为标准偏差,即连续 11 次测量空白溶液吸光度的标准偏差。K 为工作曲线的斜率,K=IF/C,公式中 IF 为特定浓度标准溶

液的荧光信号值,C 为相应标准溶液浓度。将铅标准溶液加入健康人血样中,配成加标样为 150 μg/L 的血液标本,使用各自方法进行标本前处理,连续测定 11 次。11 次测定的吸光度值的标准偏差(*s*)除以吸光度值的平均值($\bar{x}$),即为该方法的 *RSD*%。*RSD*%=*s*/ $\bar{x}$ ×100%。

1.3.4 准确度测定 准确度的测定采用加标回收试验来完成,取 30 mL 铅本底浓度为 32.5 μg/L 的健康人血样,充分混匀后平均分为 3 份,第 1 份吸弃 1.121 mL,加入 1.121 mL 浓度为 300 μg/L 的铅标准溶液,混合均匀;第 2 份吸弃 2.243 mL,加入 2.243 mL 浓度为 300 μg/L 的铅标准溶液,混合均匀;第 3 份吸弃 3.364 mL,加入 3.364 mL 浓度为 300 μg/L 的铅标准溶液,混合均匀。即配成加标量分别为 30、60、90 μg/L,理论浓度分别约为 62.5、92.5、122.5 μg/L 的加标血样。用各自前处理方法进行标本处理,然后进行加标回收试验。

回收率(%)= $\frac{\text{实测值}(\mu\text{g/L})-\text{本底值}(\mu\text{g/L})}{\text{加标量}(\mu\text{g/L})}\times 100\%$

1.4 统计学方法 选取 50 份新鲜肝素抗凝成年人全血标本。每份标本平均分为 3 份分别用 3 种前处理方法对样本进行处理后测定,采用 SPSS 19.0 软件包进行数据分析。该资料为随机区组设计的计量资料,故采用随机区组设计方差分析对结果数据进行统计分析,设 α=0.05,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种前处理方法标准曲线、*r* 检出限(DL)、*RSD*% 对比见表 3。将 3 种前处理方法制备的标准曲线溶液置于原子吸收分光光度计加样盘上进行检测。

表 3 3 种方法各项检测指标对比

方法	回归曲线	<i>r</i>	DL (μg/L)	<i>RSD</i> %
酸脱蛋白法	Y=0.001 521X-0.006 7	0.996 5	5.4	4.1
混合基体改进剂法	Y=0.000 769X-0.025 9	0.994 2	3.6	4.5
微波消解法	Y=0.003 921X+0.087 9	0.999 5	2.7	2.8

2.2 3 种前处理方法准确度比较 见表 4。

表 4 3 种前处理方法加标回收试验结果

方法	本底值 (μg/L)	加标量 (μg/L)	测定 次数	测定均值 (μg/L)	回收率 (%)	平均 回收率(%)
酸脱蛋白法	32.5	30	5	63.5	103.3	99.00
	32.5	60	5	91.3	98.0	
	32.5	90	5	118.6	95.7	
混合基体改进剂法	32.5	30	5	62.1	98.7	102.13
	32.5	60	5	95.2	104.5	
	32.5	90	5	125.4	103.2	
微波消解法	32.5	30	5	63.2	102.3	100.59
	32.5	60	5	91.5	98.3	
	32.5	90	5	123.5	101.1	

2.3 对 50 份新鲜肝素抗凝成年人全血标本用 3 种前处理方法处理后检测所得结果,采用随机区组设计方差分析进行统计

分析得到 $F=0.582$, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 不需要做两两比较 q 检验。

3 讨 论

通过本文一系列试验可以看出, 在批量成人血铅的检测中微波消解法及混合基体改进剂法同国标中酸脱蛋白法前处理标本, 最终所测结果差异无统计学意义 ($P>0.05$), 由此表明微波消解法是同国标中酸脱蛋白法一样可靠的标本前处理手段。而从标准曲线线性来看, 微波消解法的曲线 $r=0.9995$ 要优于酸脱蛋白法的 $r=0.9965$ 及混合基体改进剂法的 $r=0.9942$; 微波消解法的 $RSD\%(2.8\%)$ 和检出限 ($2.7\text{ }\mu\text{g/L}$) 也显著低于酸脱蛋白法的 $RSD\%(4.1\%)$ 和检出限 ($5.4\text{ }\mu\text{g/L}$) 及混合基体改进剂法的 $RSD\%(4.5\%)$ 和检出限 ($3.6\text{ }\mu\text{g/L}$)。

3.1 酸脱蛋白法 最经典、最常用的血铅标本前处理方法, 使用试剂单一, 前处理步骤简单。但由于采用了牛血配制标准曲线, 基质成分复杂, 标准曲线相关系数较差 ($r=0.9965$), 并且 $5\%\text{ HNO}_3$ 并不能彻底消除牛血中各种复杂成分的干扰, 最后离心出的上清液中有有机物成分较多, 平台石墨管容易积碳, 导致 $RSD\%$ 较高, 检出限高。

3.2 混合基体改进剂法 通过加入一系列混合基体改进剂能有效减少血样中基质干扰, 增加样品中铅稳定性^[5], 降低液体表面张力, 改善进样效果^[8]。直接进样的方法免去了离心分离上清液的步骤, 进一步降低了工作量。但由于无离心过程, 进样溶液中有有机物含量较酸脱蛋白法更多, 平台石墨管在长时间使用后积碳现象更严重, 影响了标准曲线的 $r, RSD\%$ 较大。而且涉及试剂较多, 增大了污染机会。

3.3 微波消解法 通过微波消解仪对血样标本进行消解, 利用微波的快速加热、过热效应、不断产生新的接触表面、降低反应活化能等特性^[9], 在较短时间内将样品中的血细胞、蛋白质等消解成大量无机离子, 基本消除了样品中的有机成分, 彻底释放出其中结合的铅离子。因此积碳现象较轻, $RSD\%$ 较低,

检出限较低, 准确度高。且标准曲线的配制无需使用牛血, 成分简单, 曲线 r 高 ($r=0.9995$)^[10]。

综上所述, 采用微波消解仪处理全血标本, 标准曲线线性、 $r, RSD\%$ 、准确度等指标均令人满意, 是血铅处理的理想方法。

参考文献

[1] 线引林. 生物材料中有毒物质分析方法手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 86.
[2] 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, 2000.
[3] 线引林. 生物材料中有毒物质分析方法手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 23-24.
[4] 吕海燕, 曹小云, 杨绿舜. 不同混合基体改进剂在测定血铅中的比较[J]. 中国医药指南, 2014, 12(8): 42-43.
[5] 王俊, 刘焕珍, 梁疆莉. 基体改进剂在血铅测定中的应用[J]. 中国职业医学, 2003, 30(3): 54-55.
[6] 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): 800-801.
[7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会, GB/T6682-2008. 分析实验室用水国家标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
[8] 徐碧珠, 黄杰周. 石墨炉原子吸收法直接测定尿中锰[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(7): 870-871.
[9] 罗琦林, 倪海燕. 浅论微波消解[J]. 天津化工, 2008, 22(2): 58-60.
[10] 车超. 全血中铅含量的微波消解-原子吸收测定法[J]. 职业与健康, 2010, 26(4): 390-391.

(收稿日期: 2013-11-05 修回日期: 2014-02-11)

(上接第 1777 页)

LM 感染脑干脑膜脑炎与一般细菌性脑膜炎难以鉴别, 病死率高, 可达 30% ^[7-8]; 由于饮食习惯不同, 在中国本病发生较少, 处于散发状态, 报道较多的为 LM 感染的脑膜脑炎, 而少有脑干脑膜脑炎。对于本病目前无早期快速的诊断方法, 因此在诊疗过程中容易忽略 LM 感染。对于此类感染性持续高热的病例, 头孢类抗菌药物治疗无效, 医生应提高警惕, 考虑到 LM 感染的可能, 在早期经验性用药时尽量覆盖 LM, 避免产生严重后果。

参考文献

[1] van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, et al. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis[J]. N Engl J Med, 2004, 351(18): 1849-1859.
[2] 刘袁媛, 张文宏, 王冯滨. 重症单核细胞增多性李斯特菌脑膜脑炎 1 例[J]. 微生物与感染, 2011, 6(3): 153-157.
[3] 陶黎黎, 胡必杰, 周春妹, 等. 3 644 瓶阳性血培养病原菌分析及双份血培养意义评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(2): 258-261.

[4] 王文娟, 刘晶, 赵金辉. 感染产单核李斯特菌的孕妇临床特点及药敏分析[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 131-132.
[5] Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(9): 2103-2108.
[6] 吴磊, 吴卫平, 黄德晖. Miller-Fisher 综合征和 Bickerstaff 脑干脑炎的临床特点及鉴别诊断[J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(2): 84-86.
[7] Thigpen MC, Whitney CG, Schuchat A et al. For the Emerging Infectious Program Network. Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007[J]. N Engl J Med, 2011, 364(21): 2016-2025.
[8] Yucel N, Citak S, Onder M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey[J]. Food Microbiol, 2005, 22(2): 241-245.

(收稿日期: 2014-01-28 修回日期: 2014-03-14)