

石墨炉原子吸收法测定血、尿铅问题的探讨

Discussion on determination of lead in blood and urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry

仲立新, 张恒东, 姜冬

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210028)

摘要: 针对采用石墨炉原子吸收光谱法测定血、尿铅的实验室普遍存在的准确度、精密度及检测结果的重现性较差等现象, 结合标准、规范和各实验室的实际情况, 探讨实验室在检测过程中关于采(留)样、样品的储存及所选择的检测方法等存在的共性问题, 并提出针对性的解决方案, 旨在进一步推动和提高生物样品检测实验室的整体水平。

关键词: 石墨炉原子吸收光谱法; 血液; 尿液; 铅

中图分类号: O613.63; O614.242 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2017)03-0236-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2017.03.030

目前报道过的血、尿铅测定方法较多。石墨炉原子吸收光谱法因所需样品量少、检测限较低而被广泛应用, 但也普遍存在一些问题。血、尿铅测定属微量分析范畴, 任何细微的内、外界因素都可能影响其结果的准确性、可靠性, 所以质量控制在血、尿铅整个分析过程中非常重要。我们结合多年的血、尿铅分析经验, 对一些实验室在石墨炉原子吸收光谱法测定血、尿铅过程中常忽略的一些技术细节作初步探讨。

1 方法

1.1 血铅

血铅的石墨炉标准测定方法主要有: (1) 根据《血中铅、镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法》(WS/T 174—1999) (简称酸脱蛋白法), 用酸脱蛋白离心后取上清液进行分析; (2) 根据《血中铅的石墨炉原子吸收光谱测定方法》(WS/T 20—1996) (简称直接稀释法), 以聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)为基体改进剂进行分析。

1.2 尿铅

尿铅的石墨炉标准测定方法主要有: (1) 根据《尿中铅的石墨炉原子吸收光谱测定方法》(WS/T 18—1996), 以磷酸二氢铵、抗坏血酸为基体改进剂进行分析; (2) 以钡盐、硝酸为基体改进剂进行分析^[1,2], 该方法已由中国疾病预防控制中心研制并报批为标准检测方法(目前未发布)。

2 质量控制

2.1 分析前的质量控制

2.1.1 采样器皿的准备

2.1.1.1 采样器皿的验收 应对同批次采样容器(采血管、血液储存管、尿液储存容器等)和用品(针、乙醇、溶液、

棉签、尿杯等)按照5%~10%的比例进行抽检, 确定其铅浓度(或含量)检测结果应低于方法定量下限。需要低温储存的容器, 应进行低温冷冻实验和验证。

2.1.1.2 采样器皿的容积 采样容器容积至少应该大于检测要求使用量, 且易于分装移出。(1)尿铅分析: 尿样的采集至少应在50 ml以上, 才能保证采集的尿样具有代表性, 故采尿容器的容积须确保在70~100 ml。(2)血铅分析: 采血管的容积最好在2~3 ml。采血管容积较小(如1 ml), 所采集的血样量较少, 不具有代表性, 同时影响血样分析的复测、留存等; 采血管容积较大(如5 ml), 会带来取样较为困难、移液器较易碰擦采血管内壁增大血样污染的几率、全血难以完全与抗凝剂充分混匀而易产生凝血现象等问题。

2.1.1.3 血铅分析所需抗凝剂的选择 采血管抗凝剂的种类应根据不同的血铅测定方法进行选择。目前市售的真空采血管所使用的抗凝剂主要有肝素盐及EDTA盐两大类。直接稀释法测定血铅对抗凝剂的种类不作特殊要求。酸脱蛋白法因其前处理方式而对抗凝剂有较高的要求, 须采用肝素盐抗凝, 如使用EDTA盐抗凝剂会使得分析结果偏低, 不同抗凝剂对血铅结果的影响情况见表1。

表1 酸脱蛋白法抗凝剂对血铅结果的影响 $\mu\text{g/L}$

血样编号	肝素盐抗凝	EDTA盐抗凝
1	285	266
2	171	159
3	376	351
4	255	239
5	186	170
6	453	408
P值	<0.01	

2.1.2 采样时的注意事项

2.1.2.1 样品空白 在样品采集的过程中, 同时制备3套样品空白。血液样品空白为用采血针模拟采集去离子水加入采血管中, 尿液样品空白为模拟采集去离子水加入尿液容器中, 并与样品同时运输和储存。

2.1.2.2 血样采集 采集血样时要彻底清洁静脉穿刺部位的皮肤, 使用无铅注射器、试管、抗凝剂等; 采血后要充分混匀、完全抗凝。总之, 防止标本污染和血液凝集是关键。采血量须在1~3 ml, 且不能超过真空采血管抗凝作用所注明的最大采血量。

真空采血管因材质、制备工艺、抗凝剂纯度等因素的限

收稿日期: 2016-11-29; 修回日期: 2017-02-23

基金项目: 江苏省科技厅科研基金资助(编号: BL2014082)

作者简介: 仲立新(1977—), 男, 硕士, 副主任技师; 主要从事理化检测工作。

通信作者: 张恒东, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: hd-zhang@263.net.

制, 铅污染的现象始终存在。当采血管中含有 5 ng 的铅污染物时, 采血量为 0.5 ml 则血铅污染水平 (血铅测定值比真值高) 约 10 $\mu\text{g/L}$; 当采血量为 2 ml 时则血铅污染水平约 2.5 $\mu\text{g/L}$ 。因此, 考虑到血样的取样、复测及采血管可能的污染, 采血量不宜少于 1 ml。血液中的铅 90% 以上与红细胞相结合, 其余在血浆中。当采血量较大 (>3 ml) 时较易产生凝血现象 (即血中大量红细胞凝集成块状), 直接影响取样的代表性, 即所取的用于处理或稀释的血液中红细胞大幅减少, 最终使得血铅测定结果偏低。

2.1.2.3 尿样采集 尿样留取后, 应在尽短的时间内测定相对密度, 再按照方法要求加入一定量的浓硝酸, 以防尿瓶内壁吸附尿样中的铅。

2.1.3 样品的储存 在样品的储存过程中, 样品中的待测物成分和性质不能发生改变; 要防止因泄漏、挥发、吸附、腐败变质和化学反应等作用造成待测物的损失和样品集体的变化; 要防止污染。酸脱蛋白法中血样保存有 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏及 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻两种方式。

2.1.3.1 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存血样 分析人员须注意冰箱冷藏区不同位置的温度差异。一般来说, 压缩机的制冷出风口在冰箱中靠里的部位, 温度在 -1 $^{\circ}\text{C}$ ~ 0 $^{\circ}\text{C}$, 较冷藏区的其它部位低, 当存放的血样放置在此位置时, 可能会造成检测结果的偏低。采用酸脱蛋白法测定血铅的实验室因血铅样本存放位置不当而造成血铅检测结果偏低的现象较为普遍。

我们做过相关实验, 随机采 10 名接触者双份血样置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放 10 d, 其中一组血样靠冰箱背存放, 另一组血样 4 $^{\circ}\text{C}$ 远靠冰箱门存放, 结果显示, 靠冰箱门一组的血铅值明显高于靠冰箱背的一组, 两组血铅检测结果差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。其原因可能是当压缩机处于工作状态时靠近冰箱背部温度较冷藏室其它部位低 (略低于 0 $^{\circ}\text{C}$), 而当压缩机暂停工作时冷藏室所有部位温度基本一致, 使得靠近冰箱背部存放的待测血样处于重复冻融状态, 在以硝酸溶液提取过程中血样较易出现凝块而使得提取效率偏低。我们建议采用酸脱蛋白法测定血铅时, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏条件下贮存血样须放置在远离压缩机制冷出风口的位置。

表 2 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放位置对血铅结果的影响 $\mu\text{g/L}$

血样编号	靠冰箱门存放	靠冰箱背存放
1	139	115
2	325	284
3	376	328
4	208	189
5	536	488
6	273	247
7	159	149
8	231	220
9	284	246
10	176	162

2.1.3.2 -18 $^{\circ}\text{C}$ 储存血样 血样尽量避免重复冻融, 否则会造成血铅结果偏低。

2.2 分析时的质量控制

2.2.1 分析方法的特点 分析人员在选择确认分析方法前, 须充分了解不同分析方法的特点, 并通过对各方法的充分论证及评估后, 择优选择最适合本实验室条件的分析方法。

2.2.1.1 血铅 血铅的两种石墨炉标准测定方法各有其优缺点, 且对仪器所配置背景校正装置的要求有一定差异。(1) 酸脱蛋白法: 与直接稀释法相比, 优点主要是在一定程度上降低了血样基体的干扰; 对石墨炉光谱仪的背景装置要求不高, 市售较为普遍的氙灯、塞曼扣除背景装置均能满足方法准确度、精密度的要求。缺点主要有需配制工作曲线, 对硝酸试剂的纯度提出较高的要求, 我们的经验是一般国产分析纯、优级纯硝酸试剂需要进一步纯化再使用, 否则会导致其空白值较高, 直接影响方法的检出限和定量下限; 操作步骤相对较为繁琐, 增加了实验的难度和费用。对于分析过程中常出现血中蛋白等与上清液不完全分离, 造成自动进样器吸样不畅, 且注样入石墨管中时样品溶液不能顺利进入石墨管底部, 直接影响测定结果准确度的情况, 可采取自动进样器先吸入 2~4 μl 0.1% TritonX-100 (v/v) 溶液再吸取样品溶液的方法。(2) 直接稀释法: 主要有样品前处理简单、对试剂要求不高等优点; 但也存在血样基质复杂、干扰较高, 对石墨炉光谱仪的背景装置要求较高, 仅塞曼扣除背景装置能满足方法准确度、精密度的要求等缺点。对于在进样一定次数后石墨管中会出现“积炭”, 直接影响分析测试的准确度现象, 一般可以通过适当减小样品进样量并同时提高“净化”温度、在升温程序中通入一定流量的空气进行灰化 (流量 50~250 ml/min, 持续 5~15 s) 两种技术手段减轻或消除“积炭”现象, 但同时前者使得方法的检出限、定量下限较高, 而后者在一定程度上降低了石墨管的使用寿命。

2.2.1.2 尿铅 尿铅的两种石墨炉测定方法中, 从使用效果 (包括方法准确度、精密度的等) 及经济方面考虑均显示钡基体改进剂较磷酸二氢铵、抗坏血酸基体改进剂更加优越。(1) 磷酸二氢铵、抗坏血酸为基体改进剂法: 磷酸二氢铵基体改进剂中含有抗坏血酸, 使得石墨管的使用寿命缩短, 进样 100~200 次便需更换; 不适合进行大量样品的测定; 在进样过程中样品灰化不彻底, 尿中基质无法去除干净, 背景干扰多; 升高灰化温度吸光度的响应会降低; 改进剂中含有抗坏血酸, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中只能保存 1 个月。(2) 钡基体改进剂法: 除钡盐外, 只含有浓度为 1% 左右的硝酸, 不影响石墨管的使用寿命、使用周期长; 可在冰箱中保存 1 年; 样品灰化温度较高, 在 800 $^{\circ}\text{C}$ ~ 1 100 $^{\circ}\text{C}$, 尿中基质去除较为干净, 背景干扰少, 且适合进行批量样品的测定。两种方法配置有氙灯、塞曼扣除背景装置的石墨炉光谱仪均能满足方法准确度、精密度的要求。

2.2.2 样品前处理

2.2.2.1 血铅 两种标准检测方法前处理方式不同。(1) 酸脱蛋白法: 硝酸的浓度最好控制在 5%~6% (v/v)。硝酸

数±标准差表示,采用 *t* 检验,计数资料应用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

两组患者肺功能检测指标 FVC、FEV_{1.0}、MVV 出院时与出院后第 6、12 个月情况及比较见表 1。

表 1 两组患者肺功能检测指标出院时与出院后比较

指标	出院时	第 6 个月	第 12 个月
观察组			
FVC (L)	2.42±0.35	2.44±0.33	2.32±0.28
FEV _{1.0} (L)	2.03±0.08	2.06±0.12	2.11±0.30 [△]
MVV (L/min)	61.40±1.16	60.95±1.07	61.30±1.51 [△]
对照组			
FVC (L)	2.30±0.33	2.27±0.26	2.29±0.32
FEV _{1.0} (L)	2.04±0.09	2.00±0.14	1.87±0.09 [*]
MVV (L/min)	61.27±1.20	61.27±1.61	58.75±1.45 [*]

注:经 *t* 检验,*,与出院时比较, $P < 0.01$; △,与对照组比较, $P < 0.01$ 。

此外,观察组患者呼吸道感染频率(43.75%)明显低于对照组(68.75%),两组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

观察组发生呼吸道感染例数明显低于对照组,FVC、FEV₁、MVV 出院时与出院后第 6、12 个月比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。造成尘肺病患者肺功能减低的主要原因是呼吸道的慢性炎症、细支气管狭窄、肺间质纤维化、肺气肿

等,而延续肺康复护理使病人得到了持续的肺康复训练,呼吸训练、运动训练、排痰训练可增强呼吸肌和辅助呼吸肌的肌力和耐力,保持气道通畅,加上合理的饮食,可进一步提高机体抵抗力和呼吸肌耐力。适时的健康宣教和心理护理,可树立病人正确的健康理念和生活方式,提高自觉持续肺康复训练的依从性。所以,观察组 FVC、FEV_{1.0}、MVV 出院时与出院后比较无明显下降,呼吸道感染的次数也明显减少。

对照组 FVC、FEV_{1.0}、MVV 出院时、出院后第 6 个月、第 12 个月呈逐渐下降趋势,且第 12 个月 FEV_{1.0}、MVV 明显低于出院时,差异有统计学意义($P < 0.01$);出院后第 12 个月肺功能检测指标比较对照组明显低于观察组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。这是由于尘肺病患者出院时虽已掌握肺康复训练技能并接受出院指导,但出院后失去护士的提醒及护理监管,大多数患者回到单位继续工作,随时间的延长,角色的转变,康复训练的依从性逐渐降低。本观察提示,延续护理在尘肺患者中的应用效果较好,能持续有效增强尘肺患者的呼吸肌肌力和耐力,改善肺功能,减少感染频次,缓解和延缓尘肺病的进展,提高患者生存质量。

参考文献:

- [1] 王翠玲,曹殿凤,李金华.综合肺康复护理对尘肺患者的影响[J].中国工业医学杂志,2010,23(5):394,399.
- [2] 孙杰,靳毅,张文君,等.综合肺康复对尘肺病患者呼吸机能的影响[J].中国康复,2012,27(2):97-98.
- [3] 闫秋丽,刘璐,章一华.尘肺病人康复护理[J].职业与健康,2010,26(16):1824-1825.

(上接第 237 页)

浓度低于 4% (*v/v*) 时样品分层不彻底的现象较为显著(仅有微量沉淀),浓度较高(>7%)时萃取分层明显,但血样加入时易出现凝块,可能造成提取效率偏低,且酸度过高测定时对石墨管损害较大,影响石墨管使用寿命。(2)直接稀释法:TritonX-100 的体积浓度应控制在 0.1%~0.3% (*v/v*)。浓度太低失去降低血样表面张力的作用;浓度太高,血样在石墨炉干燥过程中产生较多的泡沫溢出石墨管,影响测定结果的准确度。本方法中硝酸的存在主要是起基体改进剂的作用,最佳浓度应在 0.1%~0.2% (*v/v*)。硝酸浓度太低不能达到基体改进的目的;硝酸浓度太高使血液红细胞等变性,加速血液红细胞等的沉降,直接影响自动进样器取样的代表性。

2.2.2.2 尿铅 受个体的饮食等影响,不同个体、不同时段所留尿液的基体波动较大,分析人员须根据实际分析情况,适当调整(增加)尿样稀释剂中硝酸的浓度降低干扰,提高测定的精密度和准确度。例如以磷酸二氢铵、抗坏血酸为基体改进剂的测定方法,对于基体特别复杂的尿样稀释液中需另加入 2%~4% (*v/v*) 的硝酸;以钡盐为基体改进剂的测定方法,对于复杂基体的尿样稀释液中需另加入 4%~10% (*v/v*) 的硝酸。

2.2.3 工作曲线的配制

2.2.3.1 空白血样 配制血铅工作曲线的空白血样可以是低本底牛血,也可采用低本底人血、羊血等。

2.2.3.2 空白尿样 配制尿铅工作曲线的空白尿样须是不接触铅的正常人混合尿样。

3 讨论

综上所述,从事生物样品检测的实验室应依据国家有关规定、标准和规范,建立一套可行的质量保证体系,对采样前的准备、采(留)样、样品的运输与储存、实验室分析等每一环节按照《质量手册》要求进行控制。

采样及分析人员的素质是保证检验结果质量的关键因素,应进行相应培训,使其专业知识和技能不断提高和更新,保证测量数据的准确性及可比性。

采用标准的分析方法是保证最终结果准确、可靠的基础,执行标准方法的目的是为了保证分析结果的重复性、再现性和准确性。分析人员应根据不同标准方法的特点来选择适合自己实验室条件的标准方法。

参考文献:

- [1] 郑丹,陆慧萍,张裕曾.尿铅、镉的石墨炉原子吸收光谱测定方法研究[J].环境与职业医学,2009,26(1):65-68.
- [2] 李春玲.尿中铅、镉石墨炉原子吸收光谱测定方法[J].卫生研究,2002,31(4):303-304.