

石墨炉原子吸收光谱法测定鼠肝脏中的铅

陈亚飞 邓丽娟 范慧红

(中国药品生物制品检定所生化药品室 北京市天坛西里 2 号 100050)

摘要 采用 2mg/mL 磷酸二氢铵-1mg/mL 硝酸镁作为混合基体改进剂, 电热石墨炉原子化系统和氘灯扣背景校正的原子吸收光谱仪测定鼠肝脏中的痕量铅。结果表明铅在 0—100ng/mL 呈良好线性关系, $r = 0.9994$, 平均回收率为 97.6%, $RSD = 2.6\%$, 检出限为 0.40ng/mL。方法操作简便, 重现性好、灵敏度高且结果准确。

关键词 石墨炉原子吸收法, 痕量铅, 肝脏。

中图分类号: O657.31

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2006)03-0598-04

1 前言

铅是一种有害的蓄积性重金属, 即使是低剂量的铅, 由于能在人体中蓄积, 连续摄入铅超过安全范围, 能不同程度地导致对人体特别是对儿童出现肾衰、反应迟钝、周围神经系统病症、造骨系统和生长发育不明显的慢性损害等。因此, 痕量铅的危害越来越引起人们的关注, 同时促进排铅食品的研究也引起了人们的重视。目前在促进排铅保健食品的申报中^[1], 其功效研究评价规定, 若食用促进排铅食品后肝脏中铅的含量明显下降, 可以作为促进排铅作用动物实验模型成立的重要指标之一。因此通过研究铅在肝脏中分布规律, 测定肝脏中铅的含量变化很有意义。

铅的定量测定已经广泛应用到多种组织的测定, 如肝脏、肾脏、脑、心脏、肺、肌肉等。国外有相关组织中铅分析的报道^[2-6]较多, 分析测定法有阳极溶出伏安法(ASV), 石墨炉原子吸收光谱法(GF-AAS), 等离子体质谱法(ICP-MS), 火焰原子吸收光谱法(AAS), 细胞原卟啉法(EP), 其中 GF-AAS 是较常用的一种, 国内相关这方面的报道很少。

本文采用磷酸二氢铵-硝酸镁作为基体改进剂, 对小鼠肝脏中的铅含量进行了测定, 获了满意的结果, 适合肝脏铅的含量测定。

2 实验部分

2.1 仪器

岛津 AA-6800 原子吸收分光光度计(日本岛津公司); GFA-EX7 石墨炉, 冷却系, ASC-6100 自动进样器, 热解涂层高密石墨管。铅空心阴极灯(日本岛津公司); 带盖 1mL 塑料样品杯。

2.2 试剂

铅标准溶液[1000 μ g/mL, GBW(E)08129, 购自国家标准物质研究中心], 测定时将此溶液用 1% 硝酸溶液逐级稀释, 并储存于聚乙烯塑料瓶中。

混合基体改进剂溶液: 分别称取磷酸二氢铵、硝酸镁适量, 用水溶解并稀释到一定浓度, 使得混合液中磷酸二氢铵、硝酸镁的浓度分别为 2.5mg/mL 和 1.25mg/mL。

① 联系人, 电话: (010) 67095489; 手机: (0) 13683167481; E-mail: chenyafei11@yahoo.com.cn

作者简介: 陈亚飞(1972—), 男, 安徽省安庆市人, 主管药师, 主要从事药品检验和质量标准制定工作。

收稿日期: 2005-12-26; 接受日期: 2006-04-14

所用试剂为优级纯, 实验用水为去离子水, 高纯氩气; 试验中所用器材均用 25% 硝酸浸泡 24h, 去离子水冲净晾干备用。

2.3 试验方法

仪器工作条件

波长: 283.3nm; 灯电流: 10mA; 光谱通带: 0.5nm; 进样量: 20 μ L; BGC-D2 方式背景校正; 保护气: 氩气; 测量方式: 峰高; 石墨炉升温程序见表 1。

表 1 石墨炉升温程序

步骤	温度 (°C)	保持时间 (s)	加热方式	灵敏度	气体类型	流量 (L/min)	采样
1	95	10	斜坡升温	常规	# 1	1.00	OFF
2	125	20	阶梯式升温	常规	# 1	1.00	OFF
3	250	10	斜坡升温	常规	# 1	1.00	OFF
4	700	10	斜坡升温	常规	# 1	1.00	OFF
5	700	20	阶梯式升温	常规	# 1	0.00	OFF
6	2200	0	阶梯式升温	高	# 1	0.00	OFF
7	2200	4	阶梯式升温	高	# 1	0.00	ON
8	2500	4	阶梯式升温	常规	# 1	1.00	OFF

3 结果与讨论

3.1 校准曲线与回归方程

取 1% 硝酸稀释的铅标准系列溶液(浓度分别为 0、50、150、250、400、600、800、1000ng/mL) 各 100 μ L 和混合基体改进剂 0.9mL, 置于 1mL 测定专用带盖塑料小杯中, 混匀, 得标准序列测定液的浓度为 0、5、15、25、40、60、80、100ng/mL, 依次编号 0—7, 置自动进样器相应位置, 按仪器工作条件测定吸光度值。

以 1—7 号管的吸光度值减去 0 号管的吸光度值为纵坐标, 加入标准铅含量为横坐标, 绘制校准曲线。铅浓度在 0—100ng/mL 范围内线性良好, 回归方程为: $y = 0.01305x + 0.008906$, $r = 0.9994$ 。

因每次开机后环境条件、仪器性能和石墨管衰减等影响, 每次测定一批样品均需重新制备校准曲线。

3.2 试验条件的优化

3.2.1 消化方法对测定的影响

在湿法消化的过程中, 我们先后尝试了 H_2SO_4 , $HClO_4-H_2O_2$, $HNO_3-H_2O_2$, $HClO_4-HNO_3$ 对鼠肝脏进行硝化, 结果表明 $HNO_3-H_2O_2$ 效果较好, 40ng/mL 时铅的回收率为 96.5%。

3.2.2 磷酸二氢铵-硝酸镁对铅的灰化温度与原子化温度的优化

原子化器的热程序主要有 4 个阶段: 干燥、灰化、原子化和净化(即冷却清洗)。干燥的目的是通过蒸发除去溶剂并确保样品的解离, 采用温度一般为 80—250 $^{\circ}C$ 。灰化: 它是继干燥后对固体残留物的碳化、热解过程, 目的是确保有机或无机基体的去除或分解, 是电热过程中关键的一步。一般基体在中等温度下(300—1500 $^{\circ}C$)即被分解。只有极大地除去基体后, 才能保证原子化器中分析物质以稳定态存在, 原子化过程产生的干扰才小。原子化: 待分析物的解离一般发生在高温 1200—2700 $^{\circ}C$, 为了获得一些瞬态自由原子, 必须很快地上升温度。所以灰化温度和原子化温度的选择是否合适直接影响样品的原子化效率。

参考仪器工作条件, 其他条件不变, 仅改变灰化温度, 测定 30ng/mL 铅标准溶液在不同灰化温度时的吸光度, 在 500 $^{\circ}C$ 时, 背景吸收较高; 随灰化温度的

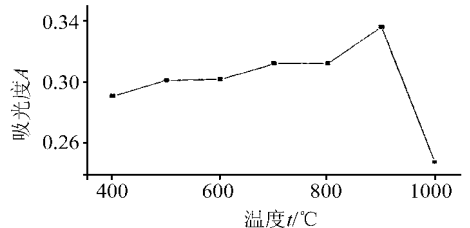


图 1 灰化温度的影响

升高,背景吸收越低。在 1000℃时,回收率仅为 8%。本文用磷酸二氢铵及硝酸镁为基体改进剂,选用的合适的灰化温度为 700℃,结果见图 1,加标回收率为 97.3%。

参考仪器工作条件,其他条件不变,仅改变原子化温度,测定 30ng/mL 铅标准溶液在不同原子化温度时的吸光度。结果见图 2,合适的原子化温度为 2200℃。

3.2.3 基体改进剂 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 用量的选择

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 是石墨炉原子吸收法测定铅最常用的基体改进剂,它的存在有利于基体成分的挥发和待测元素与基体干扰物质的分离,提高铅的原子化效率。本文对 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 的加入量进行了单因素分析,发现 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 在肝脏样液中的浓度为 2mg/mL 时,测定的灵敏度较好。

$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 镁在铅的回收率方面起着重要的作用,它对提高铅的稳定性,降低基体及共存元素影响,提高分析的灵敏度和精确度也均有明显的效果,最后确定最佳浓度为 1mg/mL。

3.2.4 共存离子的影响

由于肝脏中共存有其他多种金属元素,对测定可能有一定干扰,在测定肝脏铅同时还考察了 Cd、Zn、Cu、Ca、Na 的含量对铅测定的影响。为了测定各自的加标回收率,分别加入 Cd、Zn、Cu、Ca、Na 的标准液,再测定铅含量,并计算加入这些物质后对铅测定的干扰程度,结果见表 2。

表 2 干扰试验结果

元 素	加入浓度	未加时铅值	加入后铅值	干扰程度 (%)
Cd^{2+}	2.0 ng/mL	89.2	90.1	+ 1.0%
Zn^{2+}	0.5 ng/mL	69.4	67.3	- 3.0%
Cu^{2+}	0.5 ng/mL	66.7	65.2	- 2.2%
Ca^{2+}	1.0 ng/mL	72.6	71.5	- 1.5%
Na^+	2.0 ng/mL	90.7	89.6	- 1.2%

3.3 方法的准确度

3.3.1 肝脏铅回收率试验

取 3 份肝脏样,分别加入已知量铅的铅标准溶液,按“3.6”进行样品处理测定($n=3$)测定结果见表 3。结果表明,此法可行。

表 3 肝脏铅回收率试验

肝重 (g)	铅含量 (ng)	加入量 (ng)	测得量 (ng)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
2.16	156.57	100	253.38	96.81		
1.23	154.79	100	251.26	96.47	97.61	1.73
2.04	136.07	100	235.63	99.56		

取“3.1”项下浓度为 60ng/mL 对照品溶液,重复进样 6 次,计录吸光度,计算 RSD 为 2.5% ($n=6$)。

3.5 方法的检出限

对空白溶液进行多次测定($n=20$),计算测定吸光度的标准偏差,以 3 倍标准偏差除以校准曲线的斜率,则得铅的检出限为 0.4ng/mL。

3.6 样品处理与测定

取连续 30 天饮用 0.1% 的醋酸铅水溶液(模型组)和去离子水(对照组)的 SPF 级 KM 种小鼠(由中国药品生物制品检定所试验动物中心提供),处死后取鼠肝并称重,置于 100mL 锥形瓶,加 4mL 硝酸放置 8h,缓慢加热并不断振摇至黄色略显混浊,放冷,加 2mL 30% 过氧化氢液,放置 2h,缓慢加热至微沸,然后再加 2mL 硝酸,缓慢加热至冒白烟,继续加热至近干,再加 1mL 硝酸,加热至近干有白色结晶,最后加 1% 硝酸溶液 4mL,得澄清液。测定时取 100 μL 此样品液,加磷酸二氢铵-硝酸镁混合基体改进剂 0.9mL,置于 1mL 的测定专用带盖塑料小杯中,混匀,连同试剂空白按仪器工作条件测定吸光度值;样品的吸收光度值减去试剂空白的吸光度值,由校准曲线查得的浓度即为肝脏中铅的浓度,测定结果见表 4,结果表明对照组小鼠的肝脏铅含量显著低于模型组($P <$

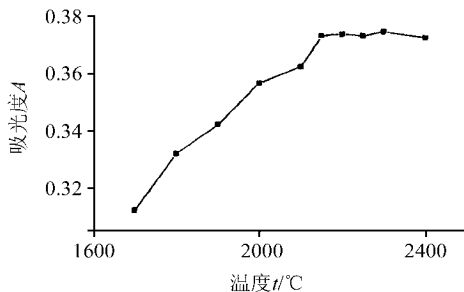


图 2 原子化温度的影响

0.001)。

表 4 肝脏中铅测定结果

组别	肝脏中的铅含量(ng/mL)										平均
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
对照组	89.2	69.4	66.7	72.6	90.7	25.6	16.2	18.5	16.1	23.0	48.8±20.0
模型组	2485.3	2301.1	2836.4	2786.1	2020.0	2508.9	2932.8	2307.3	2074.5	2741.4	2499.4±90.0

4 结论

(1) 在消化的过程中, 我们先后尝试了不同浓度的 H_2SO_4 , $\text{HClO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, HClO_4 , $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$ 对肝脏样进行硝化, 结果表明, 高氯酸和硫酸随酸度增加使铅的吸光度降低, 回收率较低, 这可能和 SO_4^{2-} 、 Cl^- 与 Pb^{2+} 形成稳定的化合物, 不利于铅的原子化有关。本试验通过提高原子化温度, 有利于铅的原子化, 降低化学干扰。

(2) 样品处理过程中, 应缓慢加热, 保持冒白烟状态, 继续加热至近干。不可过热, 否则锥形瓶内的硝酸盐容易着火, 导致回收率和测定结果偏低。

(3) 介质选择过程中, 发现用硝酸浓度为 0.2%—6%, 高氯酸为 0.5% 以下, 对铅的吸光度无影响, 本试验选用 1% 硝酸作介质。

(4) 磷酸二氢铵是铅测定时常用的基体改进剂, 能提高铅的灰化温度, 降低基体和共存元素的干扰。由于铅的易挥发性, 在热解预处理时不加基体改进剂时, 灰化温度在 450℃ 时已开始损失。本文分别试验了 $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Pd}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Mg}(\text{NO}_3)_2$ 作基体改进剂, 分别进行不同灰化温度试验, 认为 $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\text{-NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 较好, 不仅提高了灰化温度, 共存元素的干扰也小, 而且铅在此条件下吸收稳定, 回收率好。

(5) 基体改进剂中的硝酸镁不仅有利于样品的灰化, 对石墨管还起到一定的保护作用, 而且还能增加铅信号的稳定性, 减少灰化阶段中铅的损失, 提高铅的回收率。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[M]. 2003 年版. 北京: 卫生部卫生法制与监督司编印, 2003. 72—73.
- [2] Eller PM, Cassinelli ME. Lead by GFAS: METHOD 7105[M]. NIOSH Manual of Analytical Methods(NMAM), 4th ed. OH: National Institute for Occupational Safety and Health, 1994. 1—4.
- [3] Michael C, Herbert R, Fresenius K. Microwave Digestion Methods for the Determination of Trace Elements in Brain and Liver Samples by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry[J]. *J. Anal. Chem.*, 1996, **355**(2): 120—128.
- [4] Flajnik C E, Shrader D. Determination Lead in Blood: Evaluating Deuterium and Zeeman Background Correction[J]. *American Clinical Laboratory*, 1994, **13**(9): 45—46.
- [5] Savin W. Graphite Furnace AAS for Biological Materials[J]. *Science of the Total Environment*, 1998, **71**: 17—36.
- [6] Carrick G R, Slavin W. Modern Graphite Furnace AAS: Part 1 and Part 2[J]. *American Laboratory*, 1988, **44B**: 188—197.

Determination of Lead in Mouse Liver by Graphite Furnace AAS

CHEN Ya-Fei DENG Li-Juan FAN Hui-Hong

(National Institute for the Control of Pharmaceutical & Biological Products, Beijing 100050, P. R. China)

Abstract Using ammonium dihydrogen phosphate-magnesium nitrate as matrix modifiers, the trace lead in mouse liver was determined by electrothermal graphite furnace atomic absorption spectrometry with D_2 background correction. An average recovery of 97.6% was obtained with a RSD of 2.6% and $r=0.9994$ in the range of 0—100ng/mL. The detection limit was 0.40ng/mL. The proposed method offers simple instrumental operation, good reproducibility, high sensitivity and accuracy.

Key words GF-AAS, Trace Lead, Liver.