

血液与尿液中铅形态化合物的 HPLC – ICP – MS 分析

吴书凡^{1,2}, 骆如欣², 张素静², 马安德^{1*}, 马 栋^{2*}

(1. 南方医科大学 公共卫生学院, 广东 广州 510515; 2. 司法鉴定科学研究院 上海市法医学重点实验室
上海市司法鉴定专业技术服务平台, 上海 200063)

摘要: 建立了血液和尿液中 2 种铅形态化合物(三甲基铅、三乙基铅)的高效液相色谱 – 电感耦合等离子体质谱(HPLC – ICP – MS)分析方法。利用苯溶液萃取铅形态化合物, 超声离心后以硫代硫酸钠溶液进行反萃取。以 0.1 mol/L 乙酸铵 – 0.1 mol/L 乙酸与甲醇为流动相进行等度洗脱, Agilent Zorbax Plus C₁₈(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm)对提取物进行分离, ICP – MS 分析样品中铅形态化合物。结果表明, 血液和尿液中 2 种铅形态化合物的线性范围分别为 3 ~ 200 ng/mL 和 5 ~ 400 ng/mL, 检出限为 0.85 ~ 1.31 ng/mL, 定量下限为 3.00 ~ 5.00 ng/mL, 日内及日间相对标准偏差(RSD)为 1.8% ~ 10%, 提取回收率为 85.3% ~ 104%, 基质效应为 88.3% ~ 117%。该方法样品前处理简单, 检出限低, 准确度高, 适用于人体血液和尿液中三甲基铅、三乙基铅的测定。

关键词: 高效液相色谱 – 电感耦合等离子体质谱(HPLC – ICP – MS); 三甲基铅; 三乙基铅; 血液; 尿液
中图分类号: O657.63; S859.81 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 – 4957(2020)06 – 0800 – 04

Analysis of Lead Compounds in Blood and Urine by HPLC – ICP – MS

WU Shu-fan^{1,2}, LUO Ru-xin², ZHANG Su-jing², MA An-de^{1*}, MA Dong^{2*}

(1. School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Shanghai Forensic Service Platform, Shanghai Key Laboratory of Forensic Medicine, Academy of Forensic Science, Shanghai 200063, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography – inductively coupled plasma – mass spectrometric(HPLC – ICP – MS) method was established for the detection of two lead compounds, i. e. trimethyllead and triethyllead in blood and urine. The samples were extracted with benzene as solvent, followed by back-extraction with sodium thiosulfate after sonication and centrifugation. The extracts were separated by HPLC using an Agilent Zorbax Plus C₁₈ column(4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm), with 0.1 mol/L ammonium acetate – 0.1 mol/L acetic acid and methanol as mobile phases by isocratic elution, and then detected by ICP – MS. Results showed that there were good linear relationships for two lead compounds in blood and urine samples in the ranges of 3 – 200 ng/mL and 5 – 400 ng/mL, with their limits of detection and limits of quantitation of 0.85 – 1.31 ng/mL and 3.00 – 5.00 ng/mL, respectively. The recoveries ranged from 85.3% to 104% with intra-day and inter-day relative standard deviations(RSD) of 1.8% – 10%, and the matrix effects of 88.3% – 117%. The developed method was simple, sensitive and accurate, and it was suitable for the determination of trimethyllead and triethyllead in human blood and urine.

Key words: high-performance liquid chromatography – inductively coupled plasma – mass spectrometry(HPLC – ICP – MS); trimethyllead; triethyllead; blood; urine

铅是法医毒物分析中关注度较高的无机毒物之一。其在自然界中分布广泛, 可在生物体内蓄积, 且因其形态不同, 毒性差异很大^[1]。铅的有机态毒性为无机态毒性的 10 ~ 100 倍, 其中, 有机铅进入人体后在人体软组织停留时间较长, 通过各器官的吸收, 可触发癌变。人体内过量沉积铅将导致神经系统的破坏和智力的明显下降^[2]。常见的有机铅包括三甲基铅(TML)、三乙基铅(TEL)、四甲基铅和

收稿日期: 2020 – 02 – 26; 修回日期: 2020 – 03 – 09

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81671868); 上海市法医学重点实验室资助项目(17DZ2273200); 国家重点专项研究项目(2016YFC0503607); 国家重点专项研究项目(2016YFC0800704); 上海市司法鉴定专业技术服务平台资助项目(16DZ2290900)

* 通讯作者: 马安德, 博士, 主任法医师, 副教授, 研究方向: 公共卫生学, E-mail: mandmy@smu.edu.cn
马 栋, 主任法医师, 研究方向: 毒物分析, E-mail: madong@ssfjd.cn

四乙基铅等, 其中四甲基铅和四乙基铅不稳定, 易降解为毒性更高的 TML 和 TEL。由于四甲基铅和四乙基铅的检测方法已有较多报道, 本研究选择 TML 和 TEL 进行形态分析。

目前, 铅形态的分析方法主要有紫外分光光度法(UV)^[3]、原子吸收光谱法(AAS)^[4]、质谱法(MS)及各种联用技术, 包括气相色谱-原子吸收光谱法(GC-AAS)、气相色谱-原子发射光谱法(GC-AES)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、气相色谱-电感耦合等离子体质谱法(GC-ICP-MS)、高效液相色谱-电感耦合等离子体质谱法(HPLC-ICP-MS)和毛细管电泳-电感耦合等离子体质谱法(CE-ICP-MS)等^[5-13]。其中, HPLC-ICP-MS 因具有接口简单、检出限更低、线性范围更宽、干扰少、前处理过程简便且对待测样品无损等优点而广泛应用于铅形态分析^[11-13]。对于 TML 和 TEL 的研究主要集中于外暴露样品, 如环境水样、土壤、海产品、动物组织等^[13-17], 关于人体生物检材中 TML 和 TEL 的研究主要针对血液、尿液中其中 1 种有机铅或无机铅^[18-21], 而同时对血液和尿液中 TML、TEL 进行形态分析的研究报道较少。血液和尿液是毒物分析领域的常用检材, 因此建立人体血液、尿液中 TML 和 TEL 的分析方法对于铅中毒的法医学评价十分必要。

本文建立了血液和尿液中 TML、TEL 的 HPLC-ICP-MS 分析技术, 所建方法准确、可靠、简便, 适用于法医毒物分析领域中铅形态的分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

赛默飞 ICAP RQ ICP-MS 仪(赛默飞世尔科技公司), Agilent 1200 HPLC 仪(配有自动进样器, 安捷伦科技有限公司), Element A10 超纯水处理系统(美国 Millipore 公司), 15 mL 聚丙烯试管(美国 Corning 公司)。36%~38% 盐酸(色谱级), 硫代硫酸钠、乙酸铵、乙酸(优级纯), 甲醇、苯(HPLC 级), TML、TEL 标准溶液(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 上述试剂均购于上海安谱公司。

1.2 溶液的配制

储备液: 用甲醇分别配制质量浓度为 1 000 ng/mL 的 TML、TEL 储备液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 备用。

标准溶液: 用甲醇将 TML、TEL 储备液逐级稀释配制成 3、5、10、20、50、100、150、200、250、300、400、500 ng/mL 的混合标准溶液。

1.3 前处理方法

血液: 取 200 μL 血液置于聚丙烯试管中, 加入 300 μL 去离子水和 500 μL 浓盐酸, 再加入 4 mL 苯溶液超声萃取 15 min, 离心 5 min(5 000 r/min), 取上清液约 3.5 mL 转移至聚丙烯试管中, 提取完上清液的血液中再加入 4 mL 苯溶液超声萃取 15 min, 离心 5 min(5 000 r/min), 取上清液约 3.5 mL, 合并两次上清液后, 加入 5 mL 硫代硫酸钠, 超声 30 min 后, 取下层溶液约 2 mL 至进样小瓶中。

尿液: 取 900 μL 尿液置于聚丙烯试管中, 加入 100 μL 去离子水, 随后重复血液样品的萃取和反萃取操作步骤。

1.4 色谱与质谱条件

HPLC 条件: Agilent Zorbax Plus C_{18} (4.6 mm \times 100 mm, 3.5 μm)分析柱; 流动相: A 相为 0.1 mol/L 乙酸铵-0.1 mol/L 乙酸, B 相为甲醇; 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 室温; 进样体积: 20 μL ; 流动相洗脱条件: A 相为 55%, B 相为 45%。

ICP-MS 条件: RF 入射功率为 1 550 W, 载气为高纯氩气, 载气流速为 0.64 L/min, 辅助气流速为 0.8 L/min, 采样锥深度为 5 mm, 泵速为 0.4 r/s , 积分时间为 0.2 s, 测量时间为 180 s。

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 色谱条件的选择 在流动相比例为 35% A 相和 65% B 相的条件下, 考察了 C_{18} (2.1 mm \times 50 mm, 3.5 μm)和 C_{18} (4.6 mm \times 100 mm, 3.5 μm)2 种 Agilent Zorbax Plus C_{18} 色谱柱对 TML 和 TEL 的分离效果。结果表明, 使用前者作为分析柱时, TML 和 TEL 不能分离, 峰形很差; 使用后者作为分析柱

时, TML 和 TEL 能分离, 但分离度较差。因此选用 C_{18} (4.6 mm × 100 mm, 3.5 μm) 分析柱, 并对流动相比例进行了优化。结果显示, 当流动相比例为 55% A 相和 45% B 相时, TML 和 TEL 可良好分离, 且峰形较好(见图 1), TML 和 TEL 的保留时间依次为 265.8、332.4 s。优化的色谱条件如“1.4”所示。

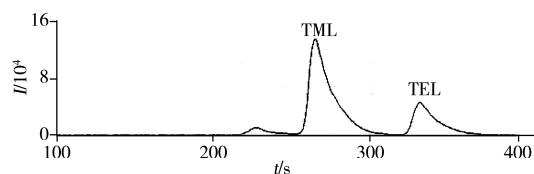


图 1 最佳色谱分离条件下 TML 和 TEL 的谱图
Fig. 1 Chromatogram of TML and TEL under optimum separation conditions

2.1.2 前处理条件的优化 取 200 μL 加入

“1.2”中系列质量浓度混合标准溶液的血液、尿液样品, 分别加入 1 mL 正己烷、乙醚溶液, 涡旋 2 min 后离心取上层溶液, 利用氮吹进行挥干后加甲醇复溶, 测定结果显示, TML 和 TEL 的提取回收率低于 50%。而采用苯溶液超声萃取 2 次, 硫代硫酸钠溶液进行反萃取的前处理方法, 测定结果显示, 血液、尿液样品中 TML 和 TEL 的提取回收率大于 80%, 因此实验选择此方法进行样品前处理。

2.2 方法学验证

2.2.1 选择性 分别对 10 个不同来源的空白血液、尿液样品按已建立的方法进行分析, 考察内源性物质是否对铅形态化合物有干扰。结果显示, 10 份不同来源的血液、尿液样品经处理后, 待测化合物对应的保留时间处均无内源性干扰峰出现, 说明内源性物质不干扰铅形态化合物的测定。

2.2.2 线性关系、检出限与定量下限 将“1.2”系列质量浓度的混合标准溶液添加至空白血液、尿液中, 按“1.3”方法对样品进行前处理后, 采用 HPLC-ICP-MS 进行检测。以 TML 和 TEL 的响应值(y , cps)与其质量浓度(x , ng/mL)进行线性拟合, 以 TML 和 TEL 的峰强度信噪比(S/N) ≥ 3 倍时的质量浓度为检出限 (LOD), S/N ≥ 10 且满足精密度和准确度要求的样品最低质量浓度为定量下限 (LOQ)。结果表明, 血液和尿液中 2 种铅形态化合物分别在 3 ~ 200 ng/mL 和 5 ~ 400 ng/mL 质量浓度范围内线性良好, 相关系数(r^2)不小于 0.994; LOD 为 0.85 ~ 1.31 ng/mL, LOQ 为 3.00 ~ 5.00 ng/mL(见表 1)。

表 1 血液、尿液中 2 种铅形态化合物的线性关系、检出限与定量下限
Table 1 Linear relationships, LODs and LOQs of two lead compounds in blood and urine

| Sample | Analyte | Linear range (ng/mL) | Linear equation | r^2 | LOD (ng/mL) | LOQ (ng/mL) |
|--------|---------|----------------------|-------------------------|-------|-------------|-------------|
| Blood | TML | 3 ~ 200 | $y = 5\ 822x + 5\ 933$ | 0.994 | 0.91 | 3.00 |
| | TEL | 3 ~ 200 | $y = 4\ 306x - 14\ 435$ | 0.994 | 0.85 | 3.00 |
| Urine | TML | 5 ~ 400 | $y = 6\ 629x - 37\ 332$ | 0.999 | 1.25 | 5.00 |
| | TEL | 5 ~ 400 | $y = 1\ 137x + 3\ 965$ | 0.996 | 1.31 | 5.00 |

2.2.3 准确度与精密度 按“1.3”方法配制样品溶液, 选择低、中、高 3 个浓度水平在空白血液、尿液中加入混合标准溶液, 每个浓度水平平行 6 份, 按照本方法进行样检测。根据当日的标准曲线, 同法连续测定 4 d, 计算准确度、日内精密度($n = 6$)和日间精密度($n = 24$), 以加标回收率表示准确度, 相对标准偏差 (RSD) 表示精密度。

结果显示, 本方法在血液和尿液的加标回收率分别为 85.3% ~ 91.8%、85.8% ~ 89.5%, 日内 RSD 为 1.8% ~ 9.9%, 日间 RSD 为 1.9% ~ 10% (见表 2), 符合方法验证学的要求。

表 2 血液、尿液中 2 种铅形态化合物的加标回收率和相对标准偏差
Table 2 Recoveries and relative standard deviations of two lead compounds in blood and urine

| Sample | Analyte | Added (ng/mL) | Found (ng/mL) | Accuracy (%) | RSD (%) | |
|--------|---------|---------------|----------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| | | | | | Intra-day ($n = 6$) | Inter-day ($n = 24$) |
| Blood | TML | 3, 50, 150 | 2.56, 42.83, 137.66 | 85.3, 85.7, 91.8 | 5.4, 2.1, 6.8 | 7.8, 3.3, 6.8 |
| | TEL | 3, 50, 150 | 2.65, 42.73, 134.54 | 88.3, 85.5, 89.7 | 7.8, 2.4, 4.5 | 10, 2.6, 3.9 |
| Urine | TML | 5, 150, 300 | 4.29, 129.58, 265.15 | 85.8, 86.4, 88.4 | 4.1, 2.6, 1.8 | 4.5, 2.3, 1.9 |
| | TEL | 5, 150, 300 | 4.37, 131.40, 268.37 | 87.4, 87.6, 89.5 | 9.9, 5.6, 2.9 | 8.9, 6.4, 2.6 |

2.2.4 提取回收率及基质效应 选取空白血液和尿液为基质, 采用低、高两个浓度水平(血液中为 3、150 ng/mL, 尿液中为 5、300 ng/mL), 按“1.3”方法对样品进行处理, 分别以空白血液和尿液提

取后、前添加混合标准溶液进样测得的峰面积为 A 、 B ，对应质量浓度混合标准溶液进样测得的峰面积为 C ，按照下式计算：基质效应 = $A/C \times 100\%$ ，提取回收率 = $B/C \times 100\%$ 。结果显示，基质效应为 88.3%~117%，提取回收率为 85.3%~104%，说明本方法无明显基质影响。

2.2.5 稳定性 分别考察了低、中、高 3 个质量浓度的空白加标样品(血液中为 3、50、150 ng/mL，尿液中为 5、150、300 ng/mL)的 3 次反复冻融稳定性(-20 °C~25 °C)及室温稳定性(25 °C 放置 24 h)，按“1.3”方法对样品进行处理，采用本方法进行检测。反复冻融稳定性考察结果显示，血液、尿液样品的 RSD 分别为 3.1%~7.4%、1.9%~5.9%；室温稳定性考察结果显示，血液、尿液样品的 RSD 分别为 1.6%~8.5%、2.4%~6.3%。该结果符合要求，表明方法稳定性良好。

2.3 案例应用

采用本方法对一误食洗鞋粉的幼童患者血样进行检测，经查询洗鞋粉成分表得知主要成分含有铅，故抽样对总铅和铅形态化合物含量进行检测。所取血样中检出 TML 和 TEL，质量浓度分别为 136、112 ng/mL。采用总铅检测方法^[21]，检出总铅的质量浓度为 742 ng/mL。

3 结论

本文采用 HPLC-ICP-MS 联用技术建立了血液和尿液中 2 种铅形态化合物 TML、TEL 的分析方法。该方法前处理简单，灵敏度高，线性范围宽，可为血液和尿液中铅形态分析提供参考。通过案例应用显示，本方法可检测人体中 TML 和 TEL 的含量，与总铅检测方法相结合，可用于样品中总铅和铅形态化合物的检测。

参考文献:

- [1] Fang Y, Yang W J, Chen Y, Ma N, Hu Q H. *J. Chin. Cereals Oils Assoc.* (方勇, 杨文建, 陈悦, 马宁, 胡秋辉. 中国粮油学报), **2013**, 28(6): 123-128.
- [2] Wan Z, Xu Z R, Wang J H. *Analyst*, **2006**, 131(1): 141-147.
- [3] Bushee D S, Krull I S, Smith S B, Schleicher R G. *Anal. Chim. Acta*, **1987**, 194: 235-245.
- [4] Blais J S, Marshall W D. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1989**, 4(7): 641.
- [5] Bergmann K, Neidhart B. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 356(1): 57-61.
- [6] Baena J R, Cárdenas S, Gallego M, Valcárce M. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(7): 1510-1517.
- [7] Heisterkamp M, Adams F C. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1998**, 362(5): 489-493.
- [8] Yan D, Yang L M, Wang Q Q. *Anal. Chem.*, **2008**, 80(15): 6104-6109.
- [9] Centineo G, Blanco-González E, Sanz-Medel A. *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1034(1/2): 191-197.
- [10] Lealgranadillo I A, Alonso J I G, Sanz-Medel A. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 423(1): 21-29.
- [11] Al-Rashdan A, Vela N P, Caruso J A, Heitkemper D T. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7(3): 551-555.
- [12] Chang L F, Jiang S J, Sahayam A C. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1176(1/2): 143-148.
- [13] Lee T H, Jiang S J. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2005**, 20(11): 1270-1274.
- [14] Pan Y H, Liu X S, He X Q, Wang C H. *Chin. J. Anal. Chem.* (潘元海, 刘湘生, 何小青, 王长华. 分析化学), **2005**, 33(11): 1560-1564.
- [15] Azenha M A G O, Vasconcelos M T S D. *Food Chem. Toxicol.*, **2000**, 38(10): 899-912.
- [16] Poperechna N, Heumann K G. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 383(2): 153-159.
- [17] Arai F. *Ind. Health*, **1986**, 24(3): 139-150.
- [18] Nygren O, Nilsson C A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1987**, 2(8): 805.
- [19] Blaszkewicz M, Baumhoer G, Neidhart B, Ohlendorf R, Linscheid M. *J. Chromatogr.*, **1988**, 439(1): 109-119.
- [20] Zachariadis G A, Rosenberg E. *J. Sep. Sci.*, **2012**, 35(9): 1132-1137.
- [21] Zhang S J. *Detection Methods and Application of 34 Elements in Blood and Urine*. Suzhou: Soochow University(张素静. 血液和尿液中 34 种元素检测方法及其应用研究. 苏州: 苏州大学), **2013**.

(责任编辑: 丁 岩)