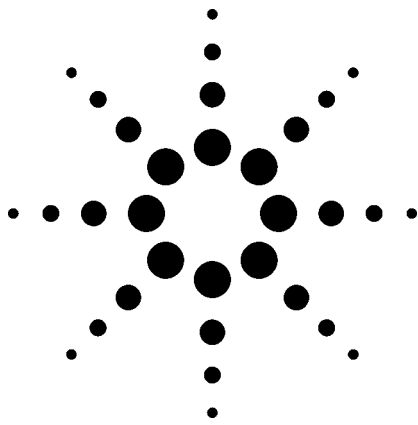


碰撞/反应池 ICP-MS 同时测定血液和血清样品中 18 个元素

应用报告



临床应用

作者

R. Wahlen, L. Evans, J. Turner, and R. Hearn
LGC Limited, Queens Road
Teddington, Middlesex, TW11 0LY
UK

摘要

本工作采用安捷伦的 7500ce 型碰撞/反应池 ICP-MS 系统，建立了实用高效的测定血液和血清样品中 18 个元素（15 个痕量元素和 3 个电解质元素）的方法。样品制备简单，只需用一种碱性稀释剂（含氨水，EDTA Triton X-100，以及 butan-1-ol）稀释即可。采用含内标的外标法进行仪器的工作曲线校准。与以前采用的扇形磁场 HR-ICP-MS 方法相比，分析方法的样品通量（分析速度）至少高 3 倍，同时方法精密度以及检出限与其相当。

引言

对诸如全血、血清以及尿液等体液样品中微量元素的分析在临床上应用已有多年，它可以提供有关毒理、工作场地的职业影响以及营养摄入等信息，也是一些疾病的诊断工具。由于不同类型临床体液样品中的许多痕量元素往往浓度低（低 ng/mL 范围）而且易变化，所以给临床分析带来了多种挑战。另外，这些样品中的基质成分，比如有机化合物、蛋白质或电解质盐类

等成分的含量一般较高（mg/mL 以上），可能对痕量元素的分析产生干扰。分析样品的基质，样品的采集量以及采样的手段也可能会带来一些问题。一般病人尿液采集方便，样品量也足够多，而全血和血清样品的采集需要用针头和注射器，可供分析的样品量较少（一般只有 μL 或 mL ）。因此，所使用的分析技术应该具备以下能力：足够低的检出限（DLs）；能克服基质干扰；有足够宽的线性范围，以满足未知样品中宽浓度范围的分析；多元素同时测定能力；分析小体积样品的能力等。

电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）能够满足上述需求，它对许多痕量金属具有极低的检出限（亚 ng/mL），干扰相对较少，可进行多元素同时检测，适合于小体积样品，能提供同位素信息，还可以用同位素稀释质谱法（IDMS）作为高可靠性的参照校准技术，所以，在临床样品分析中的应用已经越来越广泛。ICP-MS 分析中，许多感兴趣的元素会受到来自样品基质的质谱干扰。在未推出足够灵敏的带碰撞/反应池（CRC）的四极杆 ICP-MS 仪器之前，通常采用扇形磁场高分辨 ICP-MS 仪器（HR-ICP-MS）[1] 或原子荧光（AF）[2]、原子吸收光谱（AAS）[3] 这些非质谱方法克服此类干扰问题。另外一种克服基质效应的途径是采用一些样品处理方法，比如用浓酸消解或灰化技术 [4]。不过，这些方法成本高，费时，不太适合于大量样品的快速分析。



Agilent Technologies

笔者实验室曾采用 HR-ICP-MS (Element 1, ThermoFinnigan) 分析了血液和血清样本, 样本采自一些进行过金属髋骨替换手术病人, 对手术前和手术后的变化进行比较。血液和血清用大约 0.7 mM 的氨水, 0.01 mM 的 EDTA, 以及 0.07% (v/v) 的 Triton X-100 按 1:20 的比例稀释; 尿样采用 1% 的 HNO₃ 按 1:15 的比例稀释。分析的目标元素是 Al, V, Co, Cr, Mo, Ni 和 Ti。该技术的主要缺点是成本高、可推广性差、分析前仪器的预备时间长、仪器的故障率高而无效待机时间长等方面的一些问题, 尤其是分析超过 30 个血浆或血清样品时, 仪器对高盐基质的承受能力不足而导致的信号不稳定。

目的

本工作的目的是建立一个基于 CRC 四极杆 ICP-MS (CRC-ICP-MS) 仪器的实用型分析方法, 样品经简单稀释后, 在一次分析中测量宽浓度范围的多种元素。

由于使用传统的样品消解技术会增加样品的处理时间和成本, 而且会带来污染问题, 所以本方法采用一种简单的稀释方法制备分析样品。

为了达到每批次分析 100 个样品的实际工作需求, 所以分析方法只能采用外标法工作曲线进行校准。由于样品的高盐基质可能导致信号漂移或频繁的系统再校准, 仪器具有最小的信号漂移是至关重要的参数。

分析的目标元素包括痕量的 Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V 和 Zn, 以及 3 个高浓度的电解质元素 K, Mg 和 Na。

仪器的灵敏度水平需要和以前本实验室采用 HR-ICP-MS 得到的检出限相当, 即对于未稀释的原始样品, 方法检出限为 0.2 ng/mL (比如, Co, Mo) 以及 1.0 ng/mL (Ni)。

样品制备

所有样品、标准以及质量控制样品 (QC) 都采用含大约 0.7 mM 的氨水, 0.01 mM 的 EDTA 以及 0.07% 的 Triton X-100 按 20 倍稀释。稀释剂中加入 1.5%

(v/v) 的 Butan-1-ol 作为碳元素来源以改善实际样品和标准品之间的基质匹配, 由此改善 As 和 Se 等元素的分析准确度, 因为这些元素在等离子体中的电离行为受碳元素浓度的影响 [6]。为了保持样品引入系统在分析期间的化学稳定性, 在样品分析前后的系统清洗也用稀释剂作为清洗液。通常采用的酸清洗液, 比如 HNO₃, 即使稀释到 1%, 也会出现临床样品中基质成分的凝结或沉淀现象, 导致样品管或雾化器堵塞。

内标元素及其浓度的选择极为重要。临床样品分析中内标元素的选择往往受到限制, 因为许多通常在环境中采用的内标元素, 在临床样品中可能以 ng/mL 的水平存在而不能使用。为了确定最合适的内标元素, 即选择样品中不含或含量最低的元素, 我们先对血浆和血清样品进行半定量分析。对于那些样品中存在的元素, 比如 Sc, 加入的内标元素浓度应该使样品本身的 Sc 与总 ⁴⁵Sc (内标+样品) 的信号相比是可忽略不计的。选定的内标元素 (Sc, Ge, Rh, In 和 Tl) 加入到稀释剂中, 其浓度为 20 ng/mL。内标以这种方式加入是为了避免传统上通过三通管在线加入内标的方法可能存在的混合不均匀的问题。

仪器

使用的仪器是安捷伦的 7500ce 八极杆反应池系统 (ORS) ICP-MS, 以三种不同的气体模式工作: 氢气, 氦气和标准模式或称为无气体模式。多元素分析采用的 ICP-MS 工作条件和目标同位素, 积分时间和气体模式列于表 1 和表 2。所有同位素的定量分析采用每个峰 3 点积分。

使用 100- μ L/min PFA 微量同心雾化器, 采用集成智能化样品引入系统 (ISIS) 的较大直径的蠕动泵以减少样品提升和清洗时间。为了最大限度地减小样品高盐基质成分对样品引入系统和等离子体的负载, 分析期间蠕动泵速设置到 0.1 rps。炬管注入管的直径是标准的 2.5-mm, 使用 Shield Torch 系统。始终使用镍锥。

每个样品的总分析时间是 208 s。其中包括顺序采用 H₂, He 和无气体模式进行样品分析以及不同气体模式切换之间约 40 s 的平衡和稳定时间。在自动进样器针头移到下一个样品之前, 每个样品或标准溶液顺序按上述 3 种模式进行测定目标元素。每个样品分析完毕后, 用 5% HNO₃ 清洗自动进样器针头 5 s, 然后用稀释剂清洗样品引入系统 30 s。

表 1. 不同气体模式使用的 ICP-MS 参数

	H ₂	He	标准 (Std)
Rf 功率 (W)	1500	1500	1500
载气 (L/min)	0.87	0.87	0.87
混合补充气 (L/min)	0.17	0.17	0.17
雾室温度 (°C)	2	2	2
池气体流速 (mL/min)	4	4	Not used

表 2. 目标分析元素的测定参数

目标元素	同位素 (m/z)	积分时间 (s)	内标 (m/z)	气体模式
Na	23	0.3	45	He
Mg	24	0.3	45	He
Al	27	3.0	45	He
K	39	0.3	45	He
V	51	1.5	45	He
Cr	53	3.0	45	He
Mn	55	0.9	45	Std
Fe	56	0.3	45	H ₂
Co	59	1.5	45	He
Ni	60	1.5	45	He
Cu	65	0.9	72	He
Zn	66	0.3	72	He
As	75	1.5	72	He
Se	78	1.5	72	H ₂
Mo	95	1.5	103	Std
Cd	111	1.5	115	Std
Sb	121	0.9	115	Std
Pb	Sum of 206, 207 and 208	0.9	205	Std

方法性能和耐用性

在 10 小时期间连续分析了血浆和血清样品 (总共 90 个样品, 包括校准标准和 QC 检验标准样) 测试了该方法的稳定性以及内标元素、校准曲线斜率以及核查标准的运行情况。

仪器稳定性 – 内标元素的信号变化

在氢气模式中, 所选择的内标元素 (Sc, Ge, Rh, In, Tl) 的信号变化是 4.8%–9.3%, 在氦气模式是 5.5%–8.2%, 标准模式是 6.7%–10.0%。这是 90 个血浆和血清样品分析程序的统计结果。图 1 是内标元素在 10 小时期间的信号变化情况。从样品 8 之后的样品数据可以看出, 一些临床样品中 Sc 的浓度是 ng/mL 水平。

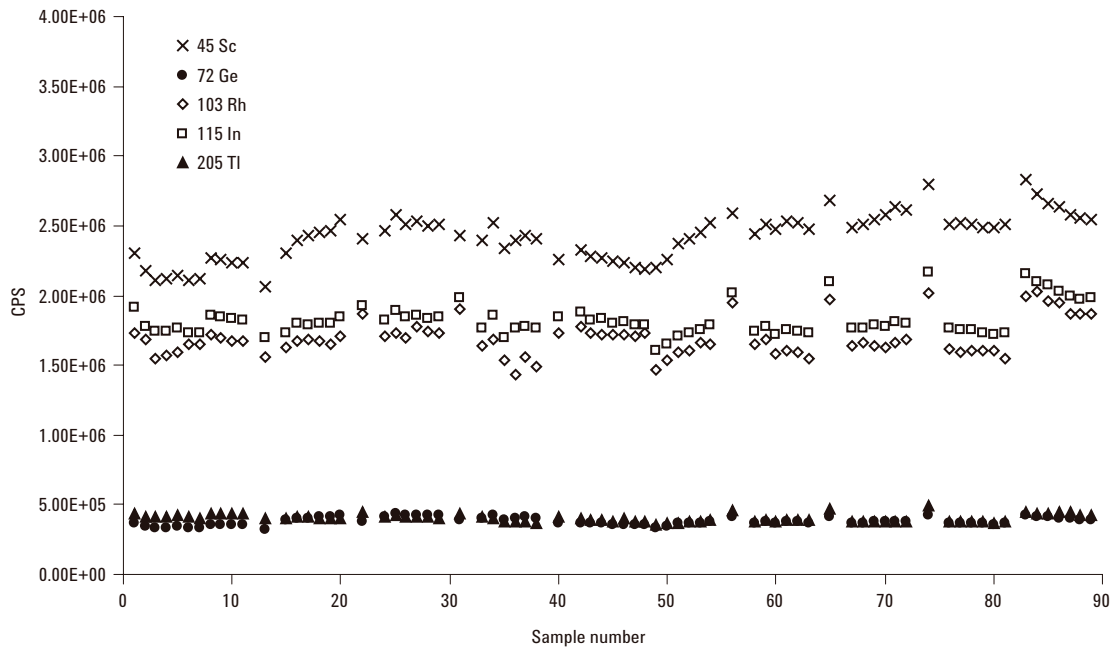


图 1. 标准模式 10 小时期间 IS 信号的变化

校准重复性和线性

将 10 小时分析期间的校准曲线（即开始、中间以及结束的校准曲线）比较，评价校准技术的耐用性。在 10 小时期间，3 个校准曲线中 V, Se 和 Pb (图 2) 平均斜率的相关系数为 0.9997–1.0000，表明了该方法对于此类基质的耐用性。所有测定元素的校准系数一般优于 $r^2 > 0.9900$ 。

核查标准

间隔 9 个样品分析一次 1 ng/mL 的痕量金属核查标准，所测元素的结果在预期值的 10% 误差范围之内。

样品基质对样品引入系统的影响

采用 HR-ICP-MS 系统分析此类基质时，在 20 倍或低于 20 倍的稀释倍数时，样品引入系统经常出现问题，尤其是炬管注入管的堵塞问题。使用上述的四极杆 ICP-MS 仪器，采用 15 或 20 倍的稀释倍数对于样品引入系统或仪器性能没有出现不利影响 (图 3)。分析后对试剂空白进行了监测，未见 DLs 有显著改变，背景本底也没有增加。

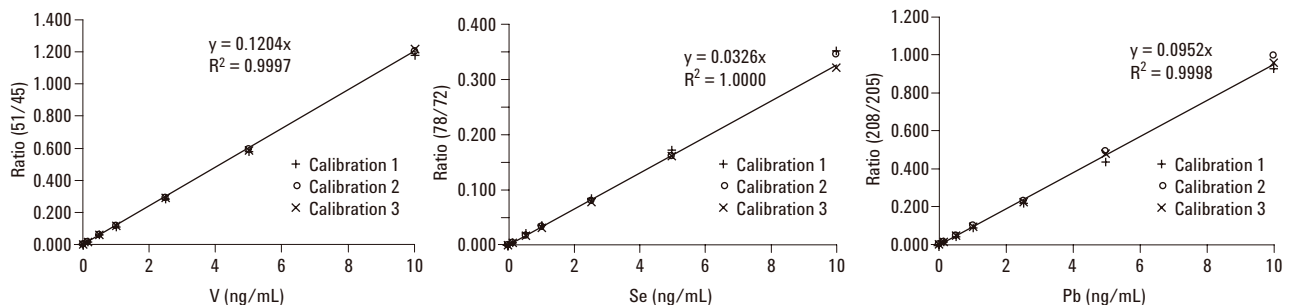


图 2. V, Se 和 Pb 的校准曲线的线性，展示了 90 个样品分析程序使用的外标法的稳定性

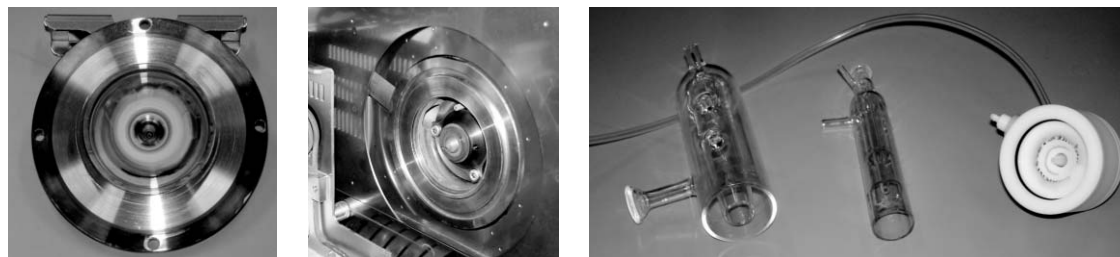


图 3. 90 个样品分析之后接口和样品引入系统的照片。采样锥和截取锥锥孔有少量的基质沉积物。2.5 mm 样品注入管相对没有沉积物。雾室和雾化器部分的血浆沉积物可以用次氯酸钠溶液除去。

标准参考物质 (CRMs) 分析

对 NIST SRM 1598 牛血清标准参考物质 (n=4) 和 Seronorm MR9067 (人体全血标准参考物质, level 2) 按上述方法稀释 20 倍后用表 1 和表 2 条件测定。选择这些标准参考物质是因为它们代表不同的临床基质, 所含的分析元素浓度范围宽, 从亚 ng/mL 到 mg/mL。这两个标准物质中同样目标元素的浓度变化超出一个数量级。这两个标准参考物质的标准值和该方法的方法检出限 DLs (背景浓度的 3 s, 并换算为未稀释样品) 见表 3。

图 4a 和图 4b 是这两个标准物质的分析结果相对于标准值的回收率数据。本研究选择的标准参考物质, 除了 Na, 所有元素都提供有标准值和不确定度, 钠是

参考值。钠相对于参考值的回收率是 99.0%。其他元素的测定值都落在了标准参考物质不确定度范围之内。有个别的元素与标准值有一定偏差 (例如 V, Cr, Cd), 其原因是 SRM 1598 的标准值低于本方法的方法检测限。SRM 1598 标准参考物质中的 Na, As, Ni 和 Pb 的数值是参考值而不是准确值, 本身就有偏差 (表 3)。

表 3. SRM NIST 1598 和 Seronorm MR9067 的标准值。为了进行比较, 已将方法的 DLs 值换算到未稀释的样品

微量元素	NIST SRM 1598 牛血清 (ng/g)	Seronorm MR9067 人血水平 2 (ng/mL)	DL (ng/mL)
Al	3.7±0.9	39–71	0.8
As	0.2*	10.6–11.8	0.1
Cd	0.089±0.016	4.8–6.0	0.1
Co	1.24±0.016	4.6–5.8	0.1
Cr	0.14±0.08	5.1–6.3	1.0
Cu	720±40	NA	0.4
Fe	2550±100	NA	19
Mn	3.78±0.32	10.1–13.3	0.1
Mo	11.5±1.1	5.3–6.7	0.1
Ni	0.7*	5.1–8.6	0.2
Pb	0.6*	373–417	0.1
Sb	NA	25–28	0.5
Se	42.4±3.5	114–130	0.2
V	0.06*	3.1–4.2	0.1
Zn	890±60	NA	3.0
常量元素	(µg/g)		(ng/mL)
K	196±5	NA	100
Mg	20.0±0.4	NA	1.5
Na	3000*	NA	5.0

*仅为参考值

NA 未提供

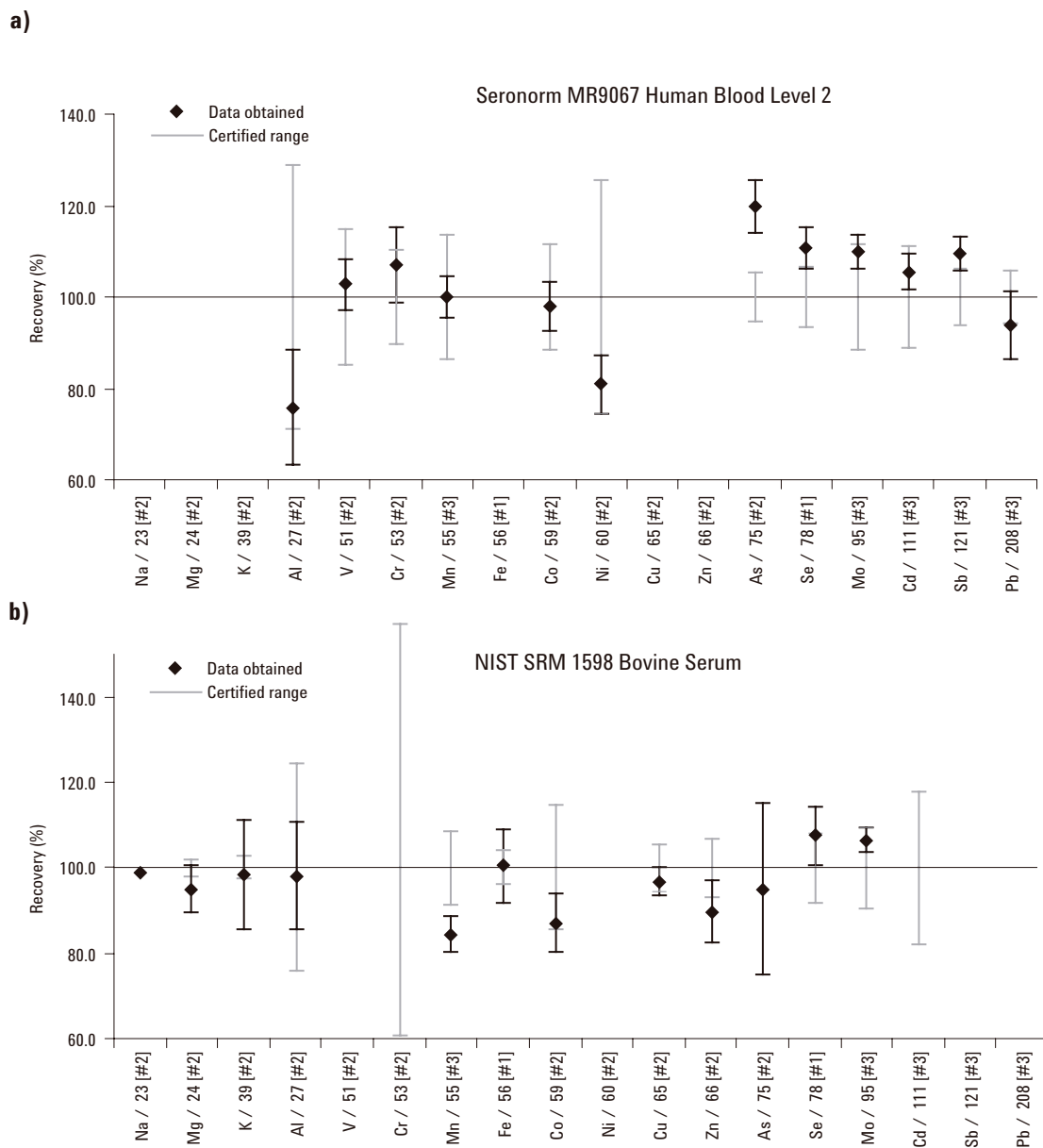


图 4. 数据比较: a) 人血 Seronorm MR9067; b) 牛血清 SRM NIST 1598; 误差棒 (Errors bars) 表示测定值和标定值的不确定度。同位素后面的数据表示所用的气体模式 (#1 = H₂, #2 = He, #3 = 标准)

基质匹配和选择内标元素的重要性

MR 9067 中 As 和 Se 的数据与标定值相比稍微高了一点, 这可能是因为该基质中碳浓度较高的缘故。当 butan-1-ol 的浓度从 0% 增加到 3% (v/v) 时, 这些元素的回收率降低并达到 100% (图 5)。当稀释剂中没有加入 butan-1-ol 时, As 和 Se 的回收率和加入 1.5%

(v/v) butan-1-ol 相比, 显著高于标定值 (分别为 94% 和 72%)。对于这两个样品的 As 和 Se, 采用标准加入法达到基质完全匹配。NIST SRM 1598 和 Seronorm MR9067 中 Se 的回收率分别为 95.8% 和 99.9%。Seronorm MR9067 中 As 的回收率为 102.6%。图 5 表明碳的加入对这两个元素的影响稍有差别。

Seronorm whole blood - MR9067

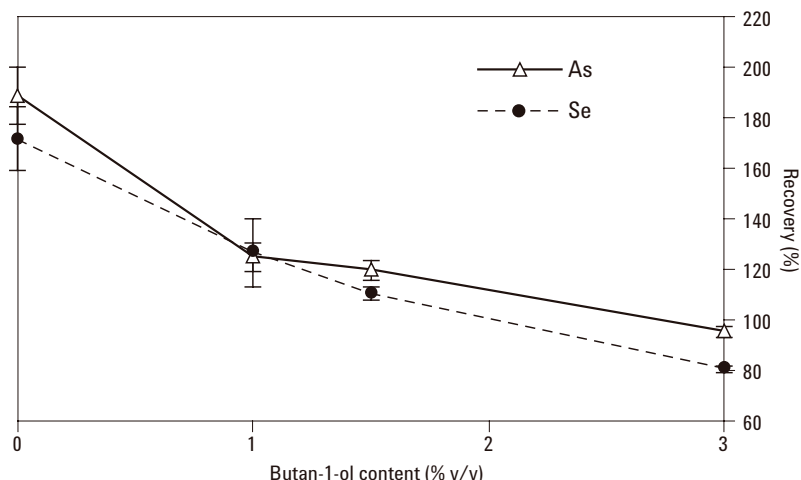


图 5. 全血 Seronorm (Level 2) 对于稀释剂中加入不同量的 butan-1-ol 时 As 和 Se 的回收率数据

从图 5 的数据看，对于这个样品和稀释水平而言，加入 3% 的 butan-1-ol 对 As 最合适（平均回收率为 $95.4 \pm 2.3\%$ ），而对于 Se，加入大约 2% 的体积最理想。

对于那些电离过程受等离子体中基质成分影响的元素，有必要获得很好的基质匹配以达到最大的准确度。如果基质不可能匹配的话，比如不同样品中含碳量变化很大，最好使用不同的样品制备方法，比如采用封闭容器微波消解法，消化有机碳基质。不过，这种方法对于大量样品分析来讲，显著增加了样品的处理时间。

率数据没有实际意义。所有痕量目标元素的平均加标回收数据列于表 4。

除了 Fe，所有元素的加标回收落在了 $100 \pm 20\%$ 之内，Se 和 Mo 在 $100 \pm 10\%$ 之内。Se 的高回收率可能是仅使用 1.5% butan-1-ol 碳含量基质匹配的原因。Mo 采用 HR-ICP-MS 分析也获得了高回收率，这种影响目前仍在进一步研究中。

加标回收数据

在两种标准参考物质中加入浓度为原始目标痕量元素浓度的 2-5 倍的标准溶液（加入浓度点在 2-4 个不同浓度水平上），进行了加标回收实验。加标回收实验中，唯一特殊的是 MR9067 中的 Fe，由于在分析前没有该元素的参考值，所以加入的浓度（20 ng/mL）与测定的样品中浓度（ $400 \pm 5 \mu\text{g/mL}$ ）相比太低，给出的回

图 4. NIST SRM 1598 牛血清和 Seronorm MR9067 人血清 (level 2) 参考物质的平均加标回收数据

	NIST SRM 1598 牛血清	Seronorm MR9067 人血清 (level 2)
100% $\pm 5\%$	Al, V, Cr, Mn, Cu, Zn, Cd, Sb, Pb	Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Cd
100% $\pm 10\%$	Co, Ni, As	Zn, As, Sb, Pb
100% $\pm 15\%$	Fe, Se	Se
100% $\pm 20\%$	Mo	Mo

结论

本工作建立了一个实用高效的针对临床体液样品的 CRC-ICP-MS 分析方法，高盐的临床基质样品经简单的稀释后，便可直接分析多种目标元素，该方法分析效率高（每批次可高达 100 个样品）。不用频繁的重新校准，在 10 小时持续分析期间得到的很小的信号漂移证明了该方法的优越性能。所得到的方法检出限与以前采用 HR-ICP-MS 方法的检出限相当。由于样品引入系统具有好的抗基质干扰能力，所以减少临床基质样品的稀释倍数还可有望改善方法的检出限。两个标准参考物质中所有目标元素（标定值的浓度范围为 ng/mL–mg/mL 水平）的测定结果在标定值的不确定范围之内，很吻合。所有元素的加标回收落在了 100 ±20% 范围之内（Fe 例外），Se 和 Mo 的回收率为 100 ±10%。

致谢

本工作是 National Measurement System Valid Analytical Measurement (VAM) 项目的一部分，该项目由 UK Department of Trade and Industry 资助。

感谢安捷伦公司对本工作所用 7500 ICP-MS 的升级提供透镜系统。

参考文献

1. C.P. Case, L. Ellis, J.C. Turner, and B. Fairman (2001) *Clinical Chemistry*, **47**, 2, 275–280.
2. J.A. Holcombe and T.M. Rettberg (1986) *Anal. Chem.*, **58**, 124R.
3. A. Taylor, and P. Green (1988) *JAAS*, **3**, 115–118.
4. L. Dunemann (1991) *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, **39**, 10, M3.
5. D. Ladon, A. Doherty, R. Newson, J. Turner, M. Bhamra, and C.P. Case (2004) *The Journal of Arthroplasty*, **19**, 8, 78–83.
6. E.H. Larsen, and S. Stürup (1994) *JAAS*, **9**, 1099–1105.

更多信息

有关我们产品和服务的更多信息请访问我们的网站：
www.agilent.com/chem/cn。

raimund.wahlen@lgc.co.uk

安捷伦公司对这一材料里可能有的错误或有关装备、性能或使用这一材料而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本材料中的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司，2005

中国印刷
2005 年 6 月 10 日
5989-2885CHCN

