

# 利用塞曼石墨炉原子吸收光谱测量血清中的硒

## 应用简报

### 临床研究

#### 作者

John Sanders

安捷伦科技公司  
澳大利亚墨尔本



## 前言

由于母婴饮食中硒的缺乏，导致一些新生儿血清样品中的硒含量仅处于  $20 \mu\text{g/L}$  的痕量水平 [9]。

此前业内已发表了大量有关通过 GFAAS 测定血液和血清中的硒的分析方法 [1,5,6,7,9]。本研究介绍了新仪器和程序的应用，这对于获得最高准确度和精密度非常重要。

硒的测定面临着诸多困难：

- $196.0 \text{ nm}$  的共振波长处于远 UV 区，样品中可能存在的有机化合物和无机化合物在该波长下均会产生分子吸收。这一问题可通过塞曼背景校正加以解决



Agilent Technologies

- 传统空心阴极灯在该波长下的强度导致精密度有限 [6]。而增强放电空心阴极灯可提高光源的强度，从而降低噪音水平。此外，选择特殊的光电倍增管有助于在该光谱区提供优异的响应
- 在血清这种复杂的样品基质中，硒可能存在于各种化学物质中的任何一种中，这会导致石墨炉的原子化器产生原子化问题。采用化学改性剂能够解决这一问题
- 硒的挥发性非常强，可能在灰化阶段产生损失。必须使用合适的改性剂与硒形成化合物，以使分析物在原子化之前能够在较高的灰化温度下尽可能多地除去基质

## 实验部分

### 仪器

本研究使用 Agilent SpectrAA-880 塞曼石墨炉原子吸收光谱仪和可编程进样器。

该仪器配备了 R166UH 光电倍增管，并在 15 mA 阴极电流和 20 mA 增强电流下操作 Se 增强放电空心阴极灯。

### 所需试剂

10% 的消泡剂 B 乳浊液 (Sigma Chemical)。重要的是，消泡剂应为具有纯白色乳状外观的稳定的分散乳液。而来自其他供应商的消泡剂产品批次出现了分离现象；这种分离的材料不能满足要求。

Triton X-100 聚乙二醇辛基苯基醚 (BDH)

硒标准品	1000 mg/L Mallinckrodt AA 标准品
Seronorm 标准品	Nycomed Pharma AS Norway 批次号 010017

血清对照样品	UTAK 痕量元素对照样品，正常浓度，批号 7772
--------	----------------------------

L-抗坏血酸	BDH AnalaR 级
--------	--------------

氯化钯	1000 mg/L Mallinckrodt AA 标准品，PdCl <sub>2</sub>
-----	---

### 试剂制备

#### 样品稀释剂

0.056% wt/vol 抗坏血酸  
0.088% vol/vol Triton X-100  
0.1% vol/vol 消泡剂 “B”

配制样品稀释剂：将 0.56 g 抗坏血酸、0.88 mL Triton X-100 和 1 mL 消泡剂 B 溶于少量去离子水中，加入 0.1 mL 盐酸并将溶液稀释至 1.0 L。

加入盐酸以降低溶液的 pH，并确保在稀释剂与血清样品混合时获得澄清溶液。尽管该溶液可保持稳定长达 2 天时间，还是建议使用当天配制的新鲜溶液。

### 自动进样器清洗

0.05% Triton X-100, 0.1% 消泡剂 B

移取 0.5 mL Triton X-100 和 1.0 mL 消泡剂 B 至 1 L 标准烧瓶中，用去离子水稀释至 1.0 L。

### 改性剂

500 mg/L 钯，0.05% Triton X-100, 0.1% 消泡剂 B：

移取 10 mL 1000 mg/L 的钯标准品和 2 mL 浓盐酸至 20 mL 标准烧瓶中。加入 100 μL Triton X-100 和 20 μL 消泡剂 B，并用去离子水稀释至 20 mL。

### 标样

标样原液 1.00 mg/L

通过使用蒸馏-去离子水将 10.00 mL 的 1000 mg/L 标准品稀释至 1 L 来配制 10 mg/L 的标样，然后通过使用样品稀释剂将 10.00 mL 10 mg/L 的标样稀释至 100 mL 来配制 1.00 mg/L 标样。

## 工作标样

依据表 1 所列的比例，分别将不同量的由样品稀释剂配制而成的标样添加至每份 Seronorm 标准品中配制工作标样。

所有溶液均在标准烧瓶中稀释至最终体积为 10 mL。

在配制溶液过程中，将 Seronorm 标准品添加至 10 mL 干燥的烧瓶中，然后加入 1 mg/L 的标样。静置约一小时，然后用样品稀释剂稀释至最终体积。

表 1. 工作标样稀释方案

溶液	Seronorm (mL)	标准溶液 (µL)	有效浓度 (µg/L)
空白样品	0	0	0
添加标样 0	1.0	0	0
添加标样 1	1.0	50	50.0
添加标样 2	1.0	100	100.0
添加标样 3	1.0	150	150.0

经试验发现，将这些标样放入带塞的玻璃标准烧瓶中置于 4 °C 的冰箱中储存，可保存一周以上。

## 自动进样器准备

将自动进样器清洗瓶注满 Triton X-100/消泡剂 B 清洗液，按照操作手册中推荐的方法对系统进行吹扫。

样品毛细管的尖端必须保持严格清洁，并且应在每次自动运行开始时用王水进行清洗。该清洗过程最好通过以下方式进行：将酸注满样品瓶（**注意**：腐蚀性极强）并手动将自动进样器探头的尖端浸至酸中。然后使用进样注射器将酸吸入毛细管中，确保所有残留物和污染物均被移除。

采用注射器将酸推入并吸出毛细管，使酸与毛细管接触 2–3 min。

最后使用 Rinse（清洗）命令除去酸并清洗毛细管两到三次。

## 样品前处理

**注意**：所有样品都应视为潜在的生物危害物，在样品处理中必须遵守当地卫生管理局所要求的全部安全预防措施。

用样品稀释剂按 1:10 的比例稀释样品（在样品体积有限的情况下，可在微量水平进行）：用 90.0 µL 样品稀释剂稀释 10.0 µL 样品，并将其直接放入样品杯中。

为保持样品与标样添加组中的改性剂浓度与添加剂相同，不得用蒸馏水稀释样品。

## 分析

采用 SpectrAA-800 标签文件创建样品列表以进行样品识别。该列表可直接从其他数据文件（如逗号分隔的文件）中导入。所示的方法采用添加预混合标样的方式，目的是获得准确一致的报告结果。由于样品的复杂性，需要使用预混合的标样。

设置表 2 中所列出的操作条件并启动序列操作。

利用 SpectrAA-800 软件中所包含的 QC 方案，该系统可通过自动重新校准或发出可疑结果警告来监视对照样品的性能和仪器性能。

表 2. 仪器设置进样器参数

方法	血清分析
元素	Se
仪器模式	吸光度
仪器类型	塞曼
校准模式	加标
校准算法	线性
测量模式	PROMT AREA
采样模式	预混合
灯位	1
灯电流	15.0 mA
狭缝宽度	1.0 nm
狭缝高度	减小
波长	196.0 nm
EHT	394 V
精密度	3.0%
最小读数	0.000
重复测定所有样品	3
背景校正	启用
最大吸光度	1.200
标样 1 浓度	50.000 µg/L
标样 2 浓度	100.000 µg/L
标样 3 浓度	150.000 µg/L
平滑	9 个点
扩展因子	1.0
QC 方案	启用

### 石墨炉参数

步骤编号	温度 (°C)	时间 (s)	载气流速 (L/min)	载气类型	读数
1	105	15.0	3.0	正常	否
2	110	20.0	3.0	正常	否
3	125	5.0	3.0	正常	否
4	300	10.0	3.0	正常	否
5	300	2.0	3.0	正常	否
6	1200	10.0	3.0	正常	否
7	1200	5.0	3.0	正常	否
8	1200	1.0	0.0	正常	否
9	2550	0.8	0.0	正常	是
10	2550	1.0	0.0	正常	是
11	2550	2.0	3.0	正常	否
12	40	21.7	3.0	正常	否

### 进样器参数

样品体积 (µL)	20
总体积 (µL)	20
改性剂 1 体积 (µL)	25

### 改性剂进样参数

热进样	是
进样速率	1
温度 (°C)	90
自定义进样	是

改性剂编号	进样前	进样同时	进样后
1	是	否	否
2	否	否	否
3	否	否	否
4	否	否	否
5	否	否	否
LDS	1	1	1
计数	1	1	1

### 结果

下列结果突出显示了使用峰高模式通过在不同时间进行的一系列分析运行所获得的准确度和精密度。

#### Seronorm 血清样品

推荐值 96 µg/L

n = 45                      平均值 = 98.5 µg/L      CV% 3.9  
 最大值 104.1            最小值 89.1

#### UTAK 对照样品

推荐值 108 µg/L

n = 33                      平均值 = 108.9              CV% 4.4  
 最大值 116.2            最小值 99.2

### 讨论

选择 1:10 的稀释比以平衡 20-30 µL 范围内准确的样品输送并最大程度减小进样针注射误差。此外，还有助于大大减少石墨管中的灰分残留。

校准曲线在吸光度 0.3 以上基本呈线性，如图 1 所示。校准曲线的回归方程为：

$$\text{ABS} = 0.00082786 * \text{Conc} + 0.00000003 * \text{Conc} [2].$$

这说明能够放心地在更广泛的分析范围内采用标样添加技术及其应用。

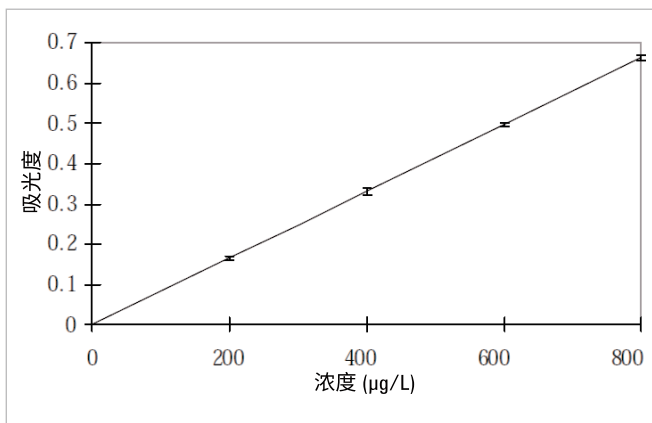


图 1. 硒元素的校准曲线

图 2 中的校准曲线显示了纯水性硒标样和其中包含血清的硒标样之间斜率的差别。该差别意味着在初始校准时使用标样添加方法在血清中配制校准标样至关重要。

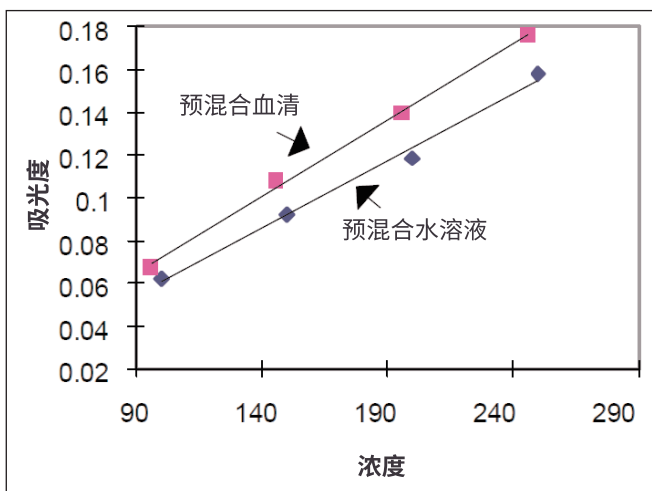


图 2. 血清标样添加校准曲线

对石墨管进行老化处理十分必要，需要使用样品或空白对石墨管进行 6 至 9 次空烧，从而在管内形成涂层。一旦形成，则不得破坏该涂层。避免使用管线清洗功能去除残留物。经试验发现，该方法能够分析 40–80 个样品且不受血清灰分残留的干扰。使用管线清洗功能将导致石墨管的寿命大大缩短且精密度下降。

使用钨作为改性剂十分方便和有效 [4,5,8]。尽管在 Se 测定中也推荐使用其他改性剂，例如镍，但是使用镍会导致石墨炉中的镍残留量较高。如果用户随后希望分析痕量的镍，这将会带来麻烦。

仪器基线噪音水平会限制分析的精密性。研究发现，有两种可用途径能够最大程度减小该噪音源。首先，使用增强放大空心阴极灯提高灯的光输出。

其次，利用特殊的 UV 敏感型光电倍增管（如 Hamamatsu R166UH）也可获得更高的增益，相比于普通 R446，该光电倍增管在低 UV 区的辐照灵敏度提高了将近六倍。R166UH 光电倍增管的另一项优势在于其在可见光区具有极小的响应，因此在使用 2500 °C 以上的原子化温度时，不易受到散射石墨炉辐射所形成的噪音的影响。图 3 和 4 对使用不同光源和检测器获得的信号进行了比较。使用 R166UH 和增强放电空心阴极灯获得的改善非常明显，并体现在分析的精密性中。此外，使用增强放电空心阴极灯和 R166UH 光电倍增管还可降低检测限。

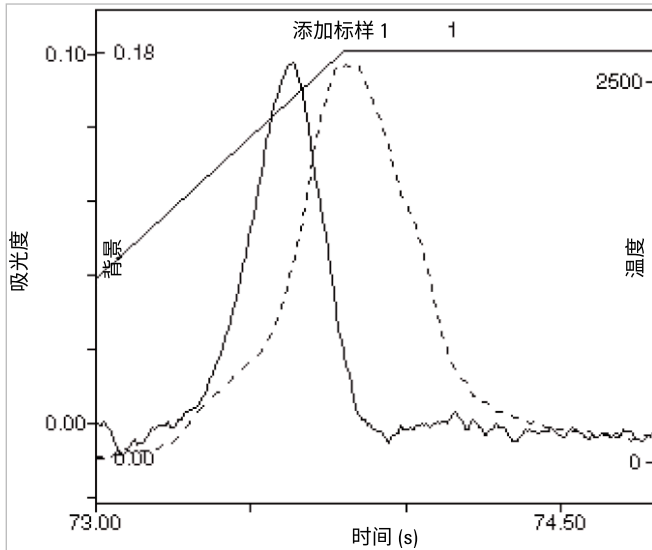


图 3. 采用 R166 光电倍增管和增强放电空心阴极灯获得的血清中硒的典型曲线

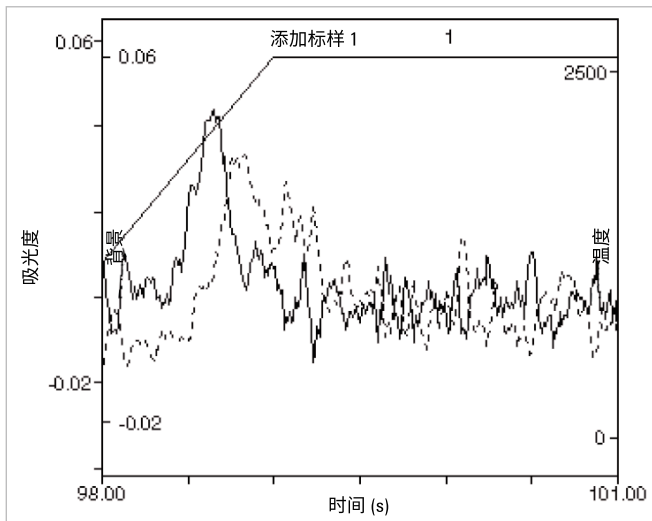


图 4. 采用 R446 光电倍增管和普通空心阴极管获得的血清中硒的典型曲线

将增强放电空心阴极灯用于硒的测定的另一项优势在于灵敏度提高，这是由于同传统的空心阴极灯相比，其在 196.0 nm 共振谱线处的信噪比得以提高。

硒的形态分析是石墨炉原子化的一个已知问题，如 Jacobson 和 Lockitch [9] 以及 Johannessen 等人 [4] 所述。这使对于通过各种技术获得的结果的总体有效性产生了一些担忧。在此背景下，本分析采用峰

面积而非峰高可能更为有利。SpectrAA-800 特别适用于本项工作，在分析低吸光度水平的样品时，可获得足够高的数值分辨率，例如小数点后四位数，并且能够同时记录峰高和峰面积结果。此外，还能够查看每次空烧的曲线，从而在确定最终结果时可以将那些表现出假峰或异常峰形的谱峰排除。表 3 数据在不同日期内获得，表明对于 UTAK 对照样品（批号 7772），通过峰面积和峰高均获得了出色的分析结果。

表 3. 多日分析结果的总结

	峰面积	峰高
平均值 (µg/L)	109.9	108.9
CV%	3.8	4.4
n3		
最小值 (µg/L)	99.1	99.2
最大值 (µg/L)	117.1	116.2
推荐值	108 µg/L	

利用石墨炉 PROMT 测量模式还可以提高分析速度。在该模式下，用户可定义所需的精密度和最多重复测定次数。一旦获得期望的精密度，系统将自动转到下一个样品。与此同时，自动进样器在当前样品原子化的过程中准备下一次进样的溶液。相比于传统仪器，每个溶液的分析速度可节省约 30 秒，获得具有已知精密度的结果，能够节省大量时间。

血清的复杂性导致蛋白质和脂肪物质积累在样品探头中和样品探头周围。采用包含乳化硅油的消泡剂 B 可以在探头的润湿表面上形成一层薄的硅油涂层，使其具有疏水性并确保表面清洁。这样可避免交叉污染并提高重现性。

消泡剂 B 还使改性剂和样品均匀分散于石墨管中，可在关键的干燥和灰化阶段中最大程度减少起泡。

## 结论

本文所述的程序为分析血清中的硒提供了一种可靠的分析方法，浓度 100  $\mu\text{g/L}$  下的变异系数优于 5%。

## 参考文献

1. M. B. Knowles and K. G. Brodie, Determination of selenium in blood by Zeeman Graphite Furnace Atomic Spectrometry using a palladium-ascorbic -acid modifier. *J. Anal At. Spectrom* (1988), 3, p 511
2. 石墨管原子化器分析方法。安捷伦科技公司。2014 年 4 月
3. B. Radzuik and Y. Thomassen, Chemical modification and spectral interference in selenium determination using Zeeman-effect Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal At. Spectrom* (1992), 7, p 397
4. J. K. Johannessen, B. Gammelgaard, O. Jons, and S.H.Hansen, Comparison of chemical modifiers for simultaneous determination of different selenium compounds in serum and urine by Zeeman-effect Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *J. Anal At. Spectrom* (1993), 8, p 999.
5. Chia-Ming Kao, Yunn-Jing Cherng, et al. Determination of total selenium in human urine and serum by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry with palladium-nickel ammonium nitrates as a matrix modifier. *Journal Chinese Chemical Society*. (1993), 40, p 33.
6. B. Pohl, B. Horstkotte, U. Steeg, Determination of As and Se By AAS using high Intensity hollow cathode lamps (使用高强度空心阴极灯通过 AAS 测定 As 和 Se)。安捷伦出版物 AA113。2010 年 11 月
7. B. Pohl, T. Schneider, Determination of normal levels of selenium in blood serum by GFAAS (利用 GFAAS 测定血清中正常浓度的硒)。安捷伦出版物 AA103。2010 年 11 月
8. B. Welz, G. Schemmler, U. Voellkopf, Influence of the valency state on the determination of selenium in GFAAS. *Spectrochimica Acta*. (1984), 39B, p 501
9. B. E. Jacobson, G. Lockitch, Direct determination of selenium in serum by GFAAS with Deuterium Background Correction and a reducing palladium modifier: Age-Specific Reference Ranges. *Clin Chem*, (1988), 34/4, p 709

查找当地的安捷伦客户中心：  
[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：  
**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：  
**LSCA-China\_800@agilent.com**

在线询价：  
[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

**[www.agilent.com](http://www.agilent.com)**

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）公司，2015  
2015年8月11日，中国出版  
出版号：AA122