

酸脱蛋白 石墨炉原子吸收法测定全血中铅含量不确定度分析

Analysis on the uncertainty in whole blood lead determination using acid deproteinization and graphite furnace atomic absorption spectrometry

曹海兰, 袁建生, 刘双德, 张金环

CAO Hai lan YUAN Jian sheng LIU Shang de ZHANG Jin huan

(青海省疾病预防控制中心, 青海 西宁 810007)

摘要: 应用测量不确定度评定理论, 结合实验方法, 确定和计算测定过程各不确定度分量, 分析石墨炉原子吸收法测定全血中铅的测量不确定度。应用该方法测定全血中铅含量为 135 μg/L 时的扩展不确定度为 13.26 μg/L, 不确定度的主要来源产生于绘制工作曲线。测量不确定度与被测量的结果同时给出, 才能说明测定结果的可信程度。

关键词: 不确定度; 石墨炉原子吸收法; 全血; 铅

中图分类号: R446 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2009)02-0138-03

本文依据《测量不确定度评定与表示》(JJF1059-1999)与《检测的不确定度评定使用指南》中的技术规范与方法, 对酸脱蛋白 石墨炉原子吸收法测定全血中铅含量的不确定度进行分析, 找出影响因素, 对不确定度进行评估, 给出扩展不确定度, 如实反映测量的置信度和准确性。

1 测量方法概述^[1]

1.1 血样预处理

以 P200 型移液器取 0.15 mL 血样于聚乙烯离心管中, 各管加入 5% 硝酸溶液 0.6 mL 立即盖好盖子, 强力振摇, 然后在漩涡混合器上振摇 1 min, 12 000 r/min 离心 5 min 待测。

1.2 血铅标准系列的配制

以 P200 型移液器分别吸取 0.0125、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mL 铅标准物质 [GBW (E) 080129 100 μg/mL] 置于 7 只 10 mL 容量瓶中, 用 1% 硝酸 (优级纯) 溶液稀释并定容至刻度。将标准溶液稀释成 0.125、2.5、5.0、7.5、10.0、12.5 μg/mL 标准系列。第一支容量瓶中以 2.0 mL 刻度吸管加入 0.2 mL 1% 硝酸溶液, 其余各容量瓶中分别加入 0.20 mL 不同浓度的标准系列, 再加 4.80 mL 新鲜牛血, 配制成 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 μg/L 血铅标准系列, 以下操作步骤同 1.1 血样预处理。取 20 μL 上清液进样, 上机测定。

1.3 样品测定与计算

用测定标准系列的操作步骤和条件测定样品。从工作曲线上直接计算出待测血样中铅的质量浓度。

2 测量数学模型

标准曲线回归方程: $A = B_1 c + B_0$

式中: A—峰面积; c—浓度值, μg/L; B_0 —截距;

B_1 —斜率

$$\text{血样中铅含量 } c (\mu\text{g/L}) = \frac{A - B_0}{B_1}$$

3 测量不确定度的来源分析

从测量方法和步骤可以看出, 主要步骤包括血样预处理、处理样液定容、仪器分析等, 其中来源于样品预处理的测量不确定度最为复杂, 如对样品预处理中每个影响因素进行定量分析是不现实的, 但可以加标回收实验来评估。本文中测量不确定度来源于血样预处理、使用的标准物质以及仪器等因素。我们从铅标准溶液的配制、工作曲线的绘制、样品测定重复性及加标回收等 4 个方面进行分析量化。

4 测量不确定度的计算

4.1 配制血铅标准溶液时产生的不确定度

4.1.1 标准储备液引入的不确定度 从铅单元素溶液标准物质 [GBW (E) 080129] 证书查得: 扩展不确定度 ($k=2, P=95\%$) 为 0.008 相对不确定度: $\frac{0.008}{2} \times 100\% = 0.4\%$ 。

4.1.2 10 mL 容量瓶在配置血铅标准系列引入的不确定度

(1) 校准: 10 mL 容量瓶规定允许误差 (《常用玻璃量器》JJG196-2006) 为 0.02 mL 假定为三角形分布 ($k=\sqrt{6}$), 不确定度为 $\frac{0.02}{\sqrt{6}} = 0.0082 \text{ mL}$ 。

(2) 重复性: 将 10 mL 容量瓶灌水至刻度线, 用天平称量, 然后倒掉水, 再灌满水至刻度线用天平称量重复测定 10 次, 用贝塞尔公式计算得到单次测量标准偏差为 0.023 mL。

(3) 温度: 室温 (20 ± 10) °C 测定, 水的膨胀系数为 $2.1 \times 10^{-4} / ^\circ\text{C}$, 由温度效应导致的体积变化不确定度为 $\pm 10 \times 10 \times 2.1 \times 10^{-4} = \pm 0.021 \text{ mL}$ 假定为矩形分布 ($k=\sqrt{3}$), 不确定度为 $\frac{0.021}{\sqrt{3}} = 0.012 \text{ mL}$ 。

(4) 容量瓶在配制血铅标准溶液中的标准不确定度:

$$\sqrt{0.0082^2 + 0.023^2 + 0.012^2} = 0.027 \text{ mL}$$

(5) 配制血铅标准容量瓶的相对不确定度:

$$\frac{0.027}{10.0} \times 100\% = 0.27\%$$

4.1.3 移液管配制血铅标准系列引入的相对不确定度

4.1.3.1 2.0 mL 分度吸管

(1) 校准: 2.0 mL 分度吸管按照《常用玻璃量器》规定允许误差为 $\pm 0.012 \text{ mL}$ 假定为三角形分布 ($k=\sqrt{6}$), 不确

收稿日期: 2008-07-07

作者简介: 曹海兰 (1969-), 女, 副主任检验技师, 从事卫生理化检验。

定度 $\frac{0.012}{\sqrt{6}} = 0.0049 \text{ mL}$

(2) 重复性: 用贝塞尔公式计算得到单次测量标准偏差为 0.0034 mL

(3) 温度: 室温和水的膨胀系数同前, 由温度效应导致的体积变化不确定度为 $\pm 2 \times 10 \times 2 \times 10^{-4} = \pm 0.0042 \text{ mL}$

假定为矩形分布 ($k=\sqrt{3}$), 不确定度为 $\frac{0.0042}{\sqrt{3}} = 0.0024 \text{ mL}$

(4) 2.0 mL 分度吸管配制血铅标准溶液中标准不确定度:

$$\sqrt{0.0049^2 + 0.0034^2 + 0.0024^2} = 0.0064 \text{ mL}$$

(5) 2.0 mL 分度吸管相对不确定度:

$$\frac{0.0064}{2.0} \times 100\% = 0.32\%$$

4.1.3.2 5.0 mL 移液管

(1) 校准: 5.0 mL 移液管按照《常用玻璃量器》规定允许误差为 $\pm 0.015 \text{ mL}$ 假定为三角形分布 ($k=\sqrt{6}$) 不确定度

为 $\frac{0.015}{\sqrt{6}} = 0.006 \text{ mL}$

(2) 重复性: 用贝塞尔公式计算得到单次测量标准偏差为 0.0026 mL

(3) 温度: 由温度效应导致的体积变化不确定度为 $\pm 5 \times 10 \times 2 \times 10^{-4} = \pm 0.0105 \text{ mL}$ 假定为矩形分布 ($k=\sqrt{3}$), 不

确定度为 $\frac{0.0105}{\sqrt{3}} = 0.0061 \text{ mL}$

(4) 5.0 mL 移液管配制血铅标准溶液中的标准不确定度:

$$\sqrt{0.006^2 + 0.0026^2 + 0.0061^2} = 0.0089 \text{ mL}$$

(5) 5.0 mL 移液管相对不确定度:

$$\frac{0.0089}{5.0} \times 100\% = 0.18\%$$

4.1.3.3 P1000型移液器

(1) 校准: 根据 P 型移液器说明书查得, 配有吉尔森优质吸嘴, P1000型移液器吸取 600μ 样液, 允许误差为 $\pm 0.004 \text{ mL}$ 假

定为三角形分布 ($k=\sqrt{6}$) 不确定度为 $\frac{0.004}{\sqrt{6}} = 0.0016 \text{ mL}$

(2) 重复性: 将 P1000型移液器调至 600μ 刻度, 移取纯水, 用天平称量, 再吸取纯水, 用天平称量, 重复 10 次. 用贝塞尔公式计算得到单次测量标准偏差为 0.0020 mL

(3) 温度: 由温度效应导致的体积变化不确定度为 $\pm 0.6 \times 10 \times 2 \times 10^{-4} = \pm 0.0013 \text{ mL}$ 假定为三角形分布 ($k=\sqrt{6}$),

不确定度为 $\frac{0.0013}{\sqrt{6}} = 0.00053 \text{ mL}$

(4) P1000型移液器配制血铅标准溶液中标准不确定度:

$$\sqrt{0.0016^2 + 0.0020^2 + 0.00053^2} = 0.0026 \text{ mL}$$

(5) 相对不确定度:

$$\frac{0.0026}{0.6} \times 100\% = 0.43\%$$

4.1.3.4 P200型移液器

(1) 校准: 以 P200型移液器吸取 150μ 样液, 规定允许

误差为 $\pm 0.0012 \text{ mL}$ 假定为三角形分布 ($k=\sqrt{6}$) 不确定度为 $\frac{0.0012}{\sqrt{6}} = 0.00049 \text{ mL}$

(2) 重复性: 将 P200型移液器调至 150μ 刻度, 用天平称量移取纯水, 再吸水至刻度线, 用天平称量, 重复 10 次. 用贝塞尔公式计算得到单次测量标准偏差为 0.00043 mL

(3) 温度: 由温度效应导致的体积变化不确定度为 $\pm 0.15 \times 10 \times 2 \times 10^{-4} = \pm 0.00032 \text{ mL}$ 假定为三角分布 (k

$=\sqrt{6}$), 不确定度为 $\frac{0.00032}{\sqrt{6}} = 0.00013 \text{ mL}$

(4) P200型移液器配制血铅标准溶液的标准不确定度:

$$\sqrt{0.00049^2 + 0.00043^2 + 0.00013^2} = 0.00066 \text{ mL}$$

(5) 相对不确定度为: $\frac{0.00066}{0.15} \times 100\% = 0.44\%$

将上述移液管移取标准引入的相对不确定度的分量合成

得: $\sqrt{2 \times 0.32\%^2 + 0.18\%^2 + 0.43\%^2 + 2 \times 0.44\%^2} = 0.89\%$

4.1.4 配制血铅标准溶液时的标准不确定度 由标准储备液、容量瓶、移液管三项引入的相对不确定度分量合成得:

$$\sqrt{0.4\%^2 + 0.27\%^2 + 0.89\%^2} = 1.01\%$$

4.2 从标准曲线求血样中铅含量时引入的相对不确定度

为了校准石墨炉原子吸收分光光度仪, 用 $(100 \pm 0.008) \text{ mg/L}$ 标准储备液配制 7 种标准工作溶液, 分别为 $0.50, 100, 200, 300, 400, 500 \mu\text{g/L}$, 用石墨炉原子吸收分光光度仪测定上述 7 种工作溶液的吸光度值, 每种标准工作液测定 2 次, 结果见表 1.

表 1 各种血铅浓度测得峰高值

血铅浓度 ($\mu\text{g/L}$)	峰高值 (A)		平均值	$B_0 + B_1 + c_0$
	A_1	A_2		
0	0.0319	0.0294	0.0307	0.0347
50	0.0601	0.0582	0.0592	0.0540
100	0.0698	0.0721	0.0710	0.0733
200	0.1156	0.1116	0.1136	0.1119
300	0.1529	0.1491	0.1510	0.1505
400	0.1887	0.1900	0.1894	0.1891
500	0.2246	0.2283	0.2265	0.2277

将表 1 中数据经线性拟合工作曲线, 以血铅浓度 (c_0) 为横坐标, 以峰高 (A) 为纵坐标, 将 7 组数据按最小二乘法拟合得到工作曲线: $A = 3.86 \times 10^{-4} c_0 + 3.47 \times 10^{-2}$, 其中: $c_0 = 0.9992$, $B_1 = 3.86 \times 10^{-4}$, $B_0 = 3.47 \times 10^{-2}$. 按实验方法对某血样测量 2 次, 由峰高值通过线性方程求得 $c_0 = 135 \mu\text{g/L}$ 由拟合直线求 c_0 时产生的标准不确定度 U_1 按以下公式计算:

$$U_1 = \frac{S_R}{B_1} \sqrt{\frac{1}{P} + \frac{1}{n} + \frac{(c_0 - \bar{c})^2}{S_{xx}}}$$

$$\text{其中: 残余标准偏差 } S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n [A_j - (B_0 + B_1 c_j)]^2}{n-2}}$$

$$= \sqrt{\frac{(0.0319 - 0.0347)^2 + (0.0294 - 0.0347)^2 + (0.0601 - 0.0540)^2 + \dots}{14-2}}$$

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (c_j - \bar{c})^2 = 2 \times (0 - 221)^2 + 2 \times (50 - 221)^2 + \dots = 209287$$

$$U_1 = \frac{3.38 \times 10^{-3}}{3.86 \times 10^{-4}} \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{14} + \frac{(135 - 221)^2}{209287}}$$

= 4.58 μg/L

$$\text{相对不确定度: } \frac{U}{c_0} = \frac{4.58}{135} \times 100\% = 3.39\%$$

4.3 样品重复测定产生的不确定度

重复测定 6 次 测定的浓度分别为 134 131 138 136 140 132 μg/L 均值为 $\bar{x} = 135 \mu\text{g/L}$ 标准不确定度 (标准偏差) $U = 3.49 \mu\text{g/L}$ 相对标准不确定度 $\frac{u}{\bar{x}} = \frac{3.49}{135} \times 100\% = 2.59\%$ 。

4.4 样品加标回收的不确定度

取 5 ml 牛血于 10 ml 比色管中, 加 1.25 ml 铅标准溶液 (10 mg/L), 并用牛血定容至刻度。与样品同步测定 6 次, 分别得出以下回收率: 107%、105%、108%、112%、106%、108%, 平均值 107.7%, 标准不确定度 (标准偏差) 2.42 相对不确定度 $= \frac{2.42}{107.7} \times 100\% = 2.25\%$ 。

5 结果

5.1 不确定度分量汇总

酸脱蛋白 石墨炉原子吸收法测定血中铅相对不确定度分量结果见表 2

5.2 合成标准不确定度

5.2.1 将 4 项 (铅标准溶液的配制、工作曲线、样品测定重复性、样品加标回收率) 相对标准不确定度用方和根法合成, 得到血铅标准合成相对标准不确定度:

$$\sqrt{1.01\%^2 + 3.39\%^2 + 2.59\%^2 + 2.25\%^2} = 4.92\%$$

表 2 酸脱蛋白 石墨炉原子吸收法测定血中铅 相对不确定度分量

序号	不确定度分量来源	相对不确定度值 (%)
1	标准溶液的配制	1.01
2	工作曲线的绘制	3.39
3	样品测定重复性	2.59
4	样品加标回收率	2.25

5.2.2 将血铅标准合成相对标准不确定度 × 血样铅浓度 (均值) 得到血铅合成标准不确定度: $4.92\% \times 135 = 6.63 \mu\text{g/L}$

5.3 扩展不确定度

酸脱蛋白 石墨炉原子吸收分光光度法测血中铅含量, 取 0.15 ml 血样, 包含因子 $k=2$ (95% 的置信度) 时, 其扩展不确定度为 $6.63 \times 2 = 13.26 \mu\text{g/L}$ 测量结果表述为测定均值 ± 不确定度 ($k=2$) = $(135 \pm 13.26) \mu\text{g/L}$

6 讨论

本报告的测量不确定度包括了样品前处理 (血样脱蛋白及离心)、标液的稀释、定容过程、测量仪器、标准溶液、环境条件、操作人员等因素的影响, 由以上各种不确定度的计算分析可发现, 测量不确定度的主要来源为从标准曲线求 c_0 时产生的不确定度、血样前处理 (加标回收) 及样品测定的重复性, 其他如玻璃器皿在转移、稀释溶液时所引起的不确定度, 取样和标准物质所带来的不确定度比较小, 说明测量仪器产生不确定度的影响较大, 所以在保证样品前处理质量的前提下, 应选择最佳的仪器工作条件, 保持仪器的稳定性, 以保证工作质量。

参考文献:

[1] 徐伯洪, 闫慧芳. 工作场所有害物质监测方法 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2003: 322-323.

(上接第 115 页)

[11] 朱云生, 杨振中, 刘文献, 等. 三硝基甲苯中毒性白内障在不同海拔地区发病情况对比分析 [J]. 中国公共卫生学报, 1997 16: 244.

[12] 姬红蓉, 张世杰, 马锡铃, 等. 紫外线对 TNT 染毒动物白内障发病影响的实验研究 [J]. 中国公共卫生学报, 1991 10: 107.

[13] Miller D. Clinical light damage to the eye [M]. New York: Spring Verlag, 1987: 26-31.

[14] 杨振中, 李迅, 刘文献, 等. 紫外光对离体羊晶状体内 TNT 的光化诱导作用 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 1998 20 (5): 409-410.

[15] 许峻峰, 李昌吉, 龙云芳, 等. TNT 白内障患者血清 GST 酶活性研究 [J]. 华西医学报, 2002 33 (1): 98-100.

[16] Spector A. Cancer W H Hydrogen Peroxide and human cataract [J]. Exp Eye Res, 1981 33: 673.

[17] 许峻峰, 李昌吉, 龙云芳, 等. GSTμ 基因缺失与 TNT 白内障发病的关系 [J]. 中国工业医学杂志, 2001 14 (3): 129-132.

[18] 杨雪萍, 权志昌, 阎文银, 等. 三硝基甲苯性白内障周边视野观察 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999 17 (6): 383-384.

[19] 杨通寿, 王传, 曹心杰, 等. TNT 白内障摘除及其超微结构观

察 [J]. 中华眼科杂志, 1987 23: 118.

[20] 杨涛, 梁康, 张昌颖. 三硝基甲苯诱发大白鼠白内障的超微结构观察 [J]. 北京医科大学学报, 1992 24 (2): 447-448.

[21] 孙即禹, 魏锡文, 翁敏恒. TNT 中毒性白内障图像标准研究 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 1993 15 (1): 14-16.

[22] 金庆新. 三硝基甲苯性白内障晶状体摄影 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2004 26 (7): 454-455.

[23] 赵家良. 晶状体病 // 惠延年. 眼科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 117.

[24] 张宏杰, 孟晓岩. TNT 性晶状体混浊五年的动态观察 [J]. 眼外伤与职业眼病杂志, 1985 7 (3): 155-156.

[25] 张天尧, 肖方威, 陆代凤, 等. 三硝基甲苯白内障患者脱离接触后晶状体混浊的变化 [J]. 中国工业医学杂志, 2002 15 (1): 46-47.

[26] 曾庆明, 张莉莉, 周生添. 三硝基甲苯作业工人脱离接触后对晶状体损害的调查分析 [J]. 中国职业医学, 2006 33 (1): 68-69.

[27] 陈淑英. 终止接触三硝基甲苯后白内障的临床研究 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2001 23 (3): 279-280.

[28] 刘玉英, 李学琴, 姚明, 等. 三硝基甲苯血红蛋白加合物与白内障的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995 13 (5): 260-261.