

血中鉛石墨爐原子吸收光譜法

方法編號：BM001	
有害物中文名稱：鉛 空氣中容許濃度：0.1 mg/m ³ 原子符號：Pb	有害物英文名稱：Lead 化學文摘社登記號碼：7439-92-1 原子量：207.20
標的物中文名稱：血中鉛 參考指標值：男性 40 μg/dL； 女性 30 μg/dL	標的物英文名稱：Lead in Blood 化學文摘社登記號碼：無
生物檢體採樣 採樣器具 容器：10 mL 無鉛試管(lead-free tube) 抗凝血劑：肝素(heparin); EDTA 採血量：>3 mL 血量 樣品穩定性：4°C@28 天	分析方法 方法：GFAAS-石墨爐原子吸收光譜法 分析物：鉛 (Pb) 稀釋：以含 0.1% (w/v) Triton X-100 及 1.25% (w/v) NH ₄ H ₂ PO ₄ 溶液稀釋樣品 波長：283.3nm 或 217.0nm 標準樣品：分析物溶於 0.5% HNO ₃ 中 分析變異係數(CVa)：3.1%
精密度與準確度 測試範圍：0.50~80 μg/dL 偏差：不顯著 總變異係數值 (CV _T)：5.3% 準確度：<10%	檢量線 檢量線範圍：0.50~80 μg/dL 可量化最低濃度：0.21 μg/dL
適用範圍：本方法適用於全血中鉛元素的分析，血中鉛之偵測極限、靈敏度，將會隨著樣品稀釋倍數及原子吸收光譜分析儀的機種而變化。適用血液樣品濃度範圍：方法偵測極限~ 80 μg/dL。	
<p>干擾：</p> <p>(一)在石墨爐加熱程序中，雖然由於原子化的過程是在惰性氣體的環境中發生，大量減少了氧化物形成的問題，但仍無法避免樣品基質的化學干擾。樣品的組成可能對分析造成影響，因此這種干擾效應分析者都應列入考慮，並加以確定。有關基質干擾或化學干擾，可用系列稀釋法或添加分析法證明其是否存在。樣品若證明有干擾存在，則可應用下列方法克服之：</p> <p>(1)連續稀釋再分析以消除干擾。</p> <p>(2)修飾樣品基質以除去干擾或穩定分析物。</p>	

- (3)使用標準添加法，使用時需考慮其限制。
- (二)在原子化過程中石墨爐內產生之氣體，可能產生分子吸收帶與分析波長重疊；當發生此種情形時，可利用背景校正或選用其他波長偵測。背景校正亦可補償非特性寬帶吸收干擾的問題。
- (三)連續光譜光源背景校正並不能校正所有類型的背景干擾，當 D2 背景校正無法有效地消除干擾時，可利用化學方法分離出分析物，或選用其他形式的背景校正法，例如 Zeeman 背景校正法
- (四)由於石墨爐原子吸收光譜儀法具有極高的靈敏度，因此跨次污染 (carry-over) 及樣品的污染成為其誤差的主要來源。因此在製備樣品的工作區域必須特別注意保持清潔，所有玻璃器皿應依照玻璃器皿清洗規定方式指示清洗。移液管的管尖經常是造成污染的來源，若懷疑可能受污染，應以 1:5 稀釋比例硝酸溶液浸洗，再以去離子水充分洗淨。此外，在分析或校正分析結果的過程中試劑空白也須特別小心。熱分解石墨爐管 (pyrolytic graphite) 在生產及處理過程中亦有可能受到污染，在使用前可能需先高溫灼熱 5 至 10 次或依廠商建議高溫灼熱程式予以清潔石墨管。

1. 試劑

- 1.1 除非有特別說明，所有的試藥必須符合美國化學學會 (ACS) 分析試藥委員會所列舉的規格。其他等級的試藥亦可使用，但首先必須確定純度夠高，不會影響分析的準確度，原則上所有試劑必須經過分析，以供證明其所有成分的含量皆低於方法偵測極限。
- 1.2 去離子水，其比電阻 (Specific resistance) 需達 $\geq 18\text{M } \Omega\text{-cm}$ 。
- 1.3 鉛標準液 $1000 \mu\text{g Pb/mL}$ ：經驗證之標準溶液，如 CertiPure standard (Merck) 或同等級產品。
- 1.4 Triton X - 100：Scintillation Grade (Merck) 或同等級產品。
- 1.5 磷酸二氫銨 (Ammonium Dihydrogen Phosphate)：Puratronic Grade (Merck) 或同等級產品。
- 1.6 濃硝酸：Superpure Grade (Merck) 或同等級產品。
- 1.7 檢量曲線稀釋溶液：在 1000 mL 量瓶內，加入 Superpure 級濃硝酸 5 mL，並以去離子水稀釋至刻度，即可得 0.5% (v/v) 之硝酸溶液。
- 1.8 鉛儲備溶液 (stock solution) 10 mg/L ：在 100 mL 量瓶內，加入 1000 mg/L 鉛標準溶液 1 mL，續以 0.5 % 硝酸溶液稀釋至刻度，即可得 10 mg/L 之鉛儲備溶液。此溶液約可保存一個月。
- 1.9 樣品稀釋溶液：在 1000 mL 量瓶內，加入 1 克 Triton X-100 及 12.5 克磷酸二氫銨 ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)，加去離子水至刻度，即可得到內含 0.1% (m/v) Triton X-100 及 1.25% (m/v) $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 之樣品稀

釋溶液。

2. 設備

2.1 採樣設備：內含肝素(heparin)或 EDTA 抗凝劑之 10 mL 無鉛試管(lead-free tube)。

2.2 原子吸收光譜儀：採用石墨爐加熱裝置附背景校正。

2.3 鉛中空陰極管或無電極燈管。

※ 所有玻璃器皿皆經 1:1 硝酸浸泡 24 小時後，以蒸餾水或去離子水清洗晾乾備用。

3. 檢體採集、運送及儲存

為避免污染導入，採取人體血液樣本時，請受檢者用肥皂將手臂內側洗淨，醫護人員以酒精棉把欲抽血處擦乾淨後，用採血器抽取 >3 mL 的血液。所採取的血液與管內抗凝血劑充分混合後，封好以冰塊保持冷度，帶回實驗室於 4 °C 下冷藏保存。樣品需在 28 天內分析完畢。採血容器需用無鉛容器、運送及保存過程應注意避免污染。

4. 檢量線標準溶液製備

4.1 標準添加校準法

4.1.1 取四支 100 ml 量瓶，各加入 0、1、2.5、5 及 8 mL 之 10 mg/L 鉛儲備溶液(步驟 1.8)，再以 0.5% (v/v) 之硝酸溶液稀釋至刻度，即可得 0、10、25、50 及 80 $\mu\text{g/dL}$ 之鉛溶液。此溶液需每日配製。

4.1.2 取四支微離心管，各加入 100 μL 待測混合血液及 800 μL 樣品稀釋溶液(步驟 1.9)，再將步驟 4.1.1 中配製之 0、10、25、50 及 80 $\mu\text{g/dL}$ 之鉛溶液各取 100 μL 至離心管內，即可分別得到 0、1、2.5、5 及 8 $\mu\text{g/dL}$ 之血液標準添加溶液並進行檢量線製備。

4.2 市售標準血樣校正法

4.2.1 取市售之標準血樣，或國際上具聲譽之機構所配製之標準血樣，至少需含五個以上不同濃度，依其所規定方法進行樣品的重建(reconstitution)。

4.2.2 將上述已重建之標準血樣，各取出 100 μL 血液置於微離心管內，並加入 900 μL 樣品稀釋溶液(步驟 1.9)，再將此微離心管充分混合後，進行檢量線製備。

5. 品管樣品(Quality control sample)製備

取確知濃度之標準血樣，依上述樣品製備步驟處理。此標準血樣

濃度範圍在校正曲線濃度中間值左右最佳，即約 20~40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 之間。若檢量線係以市售之標準血樣製備時，應使用不同來源之標準血樣作為品管樣品，亦即使用不同廠牌或不同機構所製作之標準血樣。

6. 試劑空白溶液 (Reagent blank)

取 100 μL 去離子水於微離心管中，再加入 900 μL 樣品稀釋溶液(步驟 1.9)，再將此微離心管充分混合後，進行空白值之測定。

7. 添加樣品 (Spike sample) 製備

7.1 依步驟 4.1.1 配製 10 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 之鉛溶液(可選擇靠近樣品濃度之標準品進行配製)。此溶液需每日重新配製。

7.2 取 100 μL 血液樣品置於微離心管中，再加入 100 μL 之鉛溶液(步驟 7.1)及 800 μL 樣品稀釋溶液(步驟 1.9)，再將此微離心管充分混合後，進行樣品添加分析。此樣品所添加之濃度為 1 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 。

8. 品質管制

8.1 空白測試及偵測極限：取試劑空白溶液進行七次分析，由其平均值及標準偏差計算偵測極限(偵測極限：三倍標準偏差)。

8.2 檢量線製備：取標準溶液進行分析，每個濃度溶液至少需分析三次，以其平均值建立校正曲線。檢量線線性相關係數(r)需大於 0.995 以上，才能進行後續的分析工作；若小於 0.995 時，則需重新配製檢量線溶液。

8.3 檢量線起初校正：以使用不同來源之標準溶液，其濃度相當於檢量線之中間點，進行檢量線之起初校正(Initial Calibration)。樣品至少需分析三次，由其平均值計算其回收率。回收率需在 95~105%之間才能進行下一步驟之分析工作。若未能在容許範圍內，則需檢查儀器條件、重新配製檢量線溶液或重新配製檢量線之校正溶液。

9. 樣品製備

將含抗凝血劑之血液樣品收集管置於混合裝置上，使樣品混合均勻。取出 100 μL 血液置於微離心管內，並加入 900 μL 樣品稀釋溶液(步驟 1.9)，再將此離心管充分混合後，取出進行分析。

9.1 樣品分析：配製樣品溶液，並依建立之檢測流程進行分析。若樣品量測之吸光度大於檢量線中最高濃度之吸光度時，應以樣品稀釋溶液稀釋至適當倍數後，重新分析。

9.2 每批次樣品(10 個為一批次；或不足 10 樣品時，仍以一批次計)

至少需進行一次品管分析(包括重覆分析、品管樣品分析及添加樣品分析)。重覆分析相對百分誤差容許範圍為 $\pm 10\%$ ，品管樣品分析回收率容許範圍為 75~125%，樣品添加分析回收率容許範圍為 75~125%。當品管樣品結果滿足品管要求時才能進行下一批次樣品的分析；若超過品管要求，需重新建立校正曲線後再重覆分析此一組樣品，直至通過品管要求。

10. 血液樣品儀器分析步驟

- 10.1 所有原子吸收光譜分析需執行適當的背景校正。
- 10.2 選擇適當的燈管後，通常需要先讓燈管預熱 15 分鐘。
- 10.3 利用這段期間調整儀器並擦拭透光玻璃，將單光器調至正確波長，選擇適當的單光器狹縫寬度 (slit)，並依照廠商的建議調整電流。
- 10.4 依照廠商的使用說明，清洗儀器自動採樣器 (autosampler) 之移液管 (pipet) 及管尖。
- 10.5 調整自動採樣器之方位角度與深度，以使樣品注入達最佳化。
- 10.6 開起石墨爐運轉程式，依廠商建議高溫加熱程式以清潔石墨管。
- 10.7 依照廠商的使用建議或文獻資料，設定血鉛分析石墨爐之最適昇溫條件。表一係以 Perkin Elmer 5100 PC AAS 機型為例，所建立之血中鉛分析之最佳溫控條件。
- 10.8 量測一系列待測標準溶液，繪製吸光度對應濃度建立檢量線。或設定直接讀取型儀器的曲線校正因子以讀取正確的濃度。
- 10.9 將一已知體積的樣品注入石墨爐中原子化，以讀取正確的吸光度，再依檢量線換算濃度。假使測得的濃度高於標準溶液的最高濃度，必須將樣品以相同的稀釋液稀釋後再測。多次注射可改善精密度。大約每注入 10 個樣品後，需分析一次查核標準溶液，此部分目的是為了監視石墨管的壽命及性能。當缺乏再現性或訊號值出現明顯的改變時表示須更換新的石墨管。

【註】 由於不同廠牌及機型的原子吸收光譜儀會有差異，因此分析人員在使用儀器時必須遵循該廠商的使用說明書操作。

表一、Perkin Elmer 5100 PC 原子吸收光譜儀之儀器分析條件（參考用）

Wavelength	283.3 nm			
Slit	0.7 nm			
Lamp type	HCL			
Current	10 mA			
Signal mode	Peak area			
Background	Zeeman background correction			
Tube type	Pyro / Platform			
Sample volume	20 μ L			
	Temp($^{\circ}$ C)	Ramp(sec)	Hold(sec)	Gas flow(ml /min)
Drying	90	15	1	Ar, 300
Drying	120	10	30	Ar, 300
Ashing	850	10	30	Ar, 300
Cooling	20	1	15	Ar, 300
Atomization	1600	0	5	--
Clean out	2650	1	5	Ar, 300

11. 計算

11.1 樣品濃度計算：將樣品溶液測量所得的平均吸光度(A_s)，在扣除空白值(A_b)後，乘以稀釋倍數 10 後再除以斜率(b)，即得樣品之濃度。

$$\text{樣品濃度}(\mu \text{ g / d L}) = \frac{(A_s - A_b) \times \text{稀釋倍數}(10)}{b}$$

11.2 重覆分析誤差：將重覆分析所得之平均吸光度，依步驟 11.1 計算其濃度 (C_1 及 C_2)，再以下式計算其相對百分誤差。

$$\text{相對百分誤差}(\%) = \frac{|C_1 - C_2|}{(C_1 + C_2)/2} \times 100$$

11.3 品管樣品回收率：將品管樣品分析所得之平均吸光度，依步驟 11.1 計算其濃度(C_q)，再參考其確認值(C_t)以下式計算其回收率。

$$\text{品管樣品回收率}(\%) = \frac{C_q}{C_t} \times 100$$

11.4 樣品添加回收率：將樣品添加前及添加後分析所得之平均吸光

度，依步驟 11.1 計算其濃度(C1 及 C2)，再以添加標準品濃度 (Cspike)及下式計算其樣品添加回收率。

$$\text{樣品添加回收率(\%)} = \frac{(C2 - C1)}{C_{\text{spike}}} \times 100$$

12. 數據報告及資料處理

- 12.1 所有分析數據及品質管制數據均需保存以便日後查核之用。
- 12.2 報告中需包括檢量線、各濃度樣品之測值、線性相關係數及其斜率、空白樣品測值、偵測極限及各品管查核之數據。
- 12.3 樣品濃度小於偵測極限時，一律以小於檢量線最低濃度表示。若樣品濃度落於可定量濃度範圍內，則報告其測定值。

13. 方法驗證

	測試 1	測試 2	測試 3
儀器	石墨爐原子吸收光譜儀 (Perkin-Elmer Analyst 800)	石墨爐原子吸收光譜儀 (Perkin-Elmer 5100PC)	石墨爐原子吸收光譜儀 (GBC-GF300)
分析條件	燈管電流: 10.0mA 偵測波長: 283.3nm 光柵 : 0.7nm 樣品進量: 20 μL	燈管電流: 10.0mA 偵測波長: 283.3nm 光柵 : 0.7nm 樣品進量: 20 μL	燈管電流: 4.0mA 偵測波長: 283.3nm 光柵: 0.5nm 樣品進量: 20 μL
平均回收率(%)	98.9%	104.3%	97.8%
CVa(%)	1.64 %	2.45 %	2.11 %

測試 1：中國醫藥大學

儀器 Perkin-Elmer Analyst 800 設定：

Step	Temp(°C)	Time (sec)		GAs Flow (mL/sec)	Gas Type
		Ramp	Hold		
Drying 1	90	10	30	250	Ar
Drying 2	120	10	30	250	Ar
Drying 3	160	10	20	250	Ar
Charring	500	20	30	80	Air
Ashing	800	10	40	250	Ar
Atomization	1600*	0	5	0	Ar
Burn out	2450	1	5	250	Ar

測試 2：高雄醫學大學

儀器 Perkin-Elmer 5100PC 設定：

Step	Temp(°C)	Time (sec)		GAs Flow (mL/sec)	Gas Type
		Ramp	Hold		
Drying 1	110	10	20	250	Ar
Drying 2	130	5	30	250	Ar
Ashing	500	10	20	250	Ar
Atomization	2000*	0	5	0	Ar
Burn out	2600	1	3	250	Ar

測試 3：國防醫學院

儀器 GBC-GF300 設定：

Step	Temp(°C)	Time (sec)		GAs Flow (mL/sec)	Gas Type
		Ramp	Hold		
Drying 1	80	10	5	250	N2
Drying 2	140	40	10	250	N2
Ashing 1	500	20	10	250	N2
Ashing 2	500	1	0.1	250	N2
Atomization	1800*	0.7	3	0	N2
Burn out	2100	0.1	2	250	N2

14. 文獻

- [1] NIOSH Manual of Analytical Method, 4th ed. NIOSH, Cincinnati, Ohio, Method 8003, 1994.
- [2] NIOSH Manual of Analytical Method, 4th ed. NIOSH, Cincinnati, Ohio, Method 7105, 1994.
- [3] NIOSH Manual of Analytical Method, 4th ed. NIOSH, Cincinnati, Ohio, Method 8005, 1994.
- [4] Tsalev DL and Zaprianov ZK. Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice- Volume I analytical aspects and health significance 2nd CRC press , 1985.
- [5] Boone J, Hearn T, Lewis S. Comparison of interlaboratory results for blood lead with results from a definitive method. Clin Chem 1979; 25:389-393.

- [6] Cox DH. Bovine blood quality control material for cadmium, mercury, and lead. J Anal Toxicol 1989; 13:367-370.
- [7] Cox DH, Duncan CE, Wyatt GP, Meadow JS, Robinson JB. Bovine blood lead reference material. J Anal Toxicol 1989; 13:204-207.
- [8] Osterloh JD, Sharp DS, Hata B. Quality control data for low lead concentration by three methods used in clinical studies. J Anal Toxicol 1990; 14:8-11.
- [9] Welz B. Atomic Absorption Spectrometry. 2nd ed. VCH publishers ; 1985.
- [10] 藍啟仁、黃傳捷、楊末雄。科儀新知 83 年；第十五卷第五期：第四十九頁。