

doi: 10.12452/j.fxcsxb.26043006

纳米金改性聚合物整体柱毛细管微萃取与ICP-MS联用在线分析细胞样品中的痕量金属

蔡亚冰, 何 蔓, 陈贝贝, 胡 斌*

(武汉大学 化学与分子科学学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 该研究通过对 Au NPs 改性的 poly(GMA-EDMA) 整体柱表面进行 L-半胱氨酸(L-Cys) 改性得到改性整体柱, 该柱的制备重现性良好(批内重现性为 2.1%~6.1%, 批间重现性为 2.4%~8.0%), 可重复使用 120 次以上, 并具有良好化学稳定性。基于此建立了聚合物整体柱毛细管微萃取(CME)与 ICP-MS 联用在线分析细胞裂解液中多种过渡金属(V、Cu、Ga、Y、In、Sn、Ce、Eu、Dy、Tm、Pb、Bi)的新方法, 并通过优化上样 pH 值、流速和体积以及解吸剂浓度和体积等得到最优萃取条件。在最佳实验条件下, 该方法对目标元素的检出限为 0.45(Eu)~15.4(Cu) ng·L⁻¹。将所建方法用于 HepG2 和 SCC-7 细胞中目标金属元素的分析, 结果表明, 细胞中各金属元素的含量处于飞克和亚飞克水平, 细胞样品中目标元素的加标回收率为 85.4%~114%。该方法不需消解, 细胞经超声破膜之后可直接萃取分析, 简化了细胞处理过程; 检出限较低, 消耗细胞数量少, 可以进行在线分析, 具有较高的样品通量(10 h⁻¹)。

关键词: 聚合物整体柱毛细管微萃取; 纳米金; 痕量元素; 电感耦合等离子体质谱; 生物样品

中图分类号: O657.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)08-0001-09

Gold Nanoparticle Modified Polymer Monolithic Microextraction Combined with ICP-MS for On-line Analysis of Trace Elements in Cells

CAI Ya-bing, HE Man, CHEN Bei-bei, HU Bin*

(College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In this work, Au NPs modified poly(glycidyl methacrylate-ethylene dimethacrylate) (poly(GMA-EDMA-Au NPs)) monolithic capillary was further functionalized with L-cysteine (L-Cys), which exhibited good preparation reproducibility and chemical stability. Based on it, a method combining polymer monolithic capillary microextraction with on-line inductively coupled plasma mass spectrometry detection was developed for the analysis of transition metals in cell samples. Various factors affecting the extraction efficiency were investigated. Under the optimized conditions, the limits of detection were in the range of 0.45(Eu)–15.41(Cu) ng·L⁻¹. The relative standard deviations were between 3.0%(Ce) and 9.3%(In). HepG2 and SCC-7 cells were analyzed after ultrasonic wall breaking, and the content of target metals was found to be at fg-sub fg level per cell, with recoveries of 85.4–114% in the spiked samples. The developed method merits low sample consumption, low detection limits and high sample throughput (10 h⁻¹) with great application potential in the analysis of precious biological samples such as cells.

Key words: polymer monolithic capillary microextraction; Au nanoparticles; trace elements; inductively coupled plasma mass spectrometry; biological samples

随着工业活动的加剧, 各种金属元素不可避免地进入环境, 并通过食物链累积, 可能对人体各个器官造成不同程度的伤害。比如, 钒(V)虽然是人体必需的微量元素, 每天的摄入量约为 20 μg, 但过多摄入会引起毒性, 损害哺乳动物的生育系统, 导致生育能力降低、胚胎畸形等^[1], 且随着化合价的升高, V 的毒性也随之增大; 基于生理 pH 值条件下, 铜(Cu)与 DNA 碱基中氮元素间较强的亲和作用,

收稿日期: 2026-04-30; 修回日期: 2026-06-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22174103)

* 通讯作者: 胡 斌, 博士, 教授, 研究方向: 原子光谱, E-mail: binhu@whu.edu.cn

过量的 Cu 会促使基因损伤, 诱导表观遗传变异^[2]; 镓(Ga)在半导体工业和医药领域被广泛使用, 在生物学上, 高浓度的 Ga 会影响人的免疫系统, 诱导细胞凋亡、影响铁的新陈代谢^[3]; 铟(In)在电子行业中常用来制造半导体、液晶屏和等离子显示器等, 过量 In 的吸入会导致肺炎、纤维变性甚至癌症, 且在肺部的去除过程非常缓慢^[4]; 锡(Sn)被大量用于饮料罐和食品包装纸, 过量 Sn 的摄入会减少血清中 Fe、Zn、Ca 等必需元素的吸收, 降低肝脏抗氧化金属酶的活性, 还会引起肠胃不适和肝损伤等^[5]; 铅(Pb)中毒会导致神经紊乱, 干扰血红素的生物合成, 引起肾毒性、高血压等^[6]; 铋(Bi)被广泛用于胃药中, 过量 Bi 会与生物分子络合, 对血液系统和神经系统产生一定毒害作用^[7-8]; 稀土元素被广泛用于催化材料和稀土微肥的合成等, 长期摄入低剂量的稀土元素会引起脑部积蓄, 诱发毒性效应^[9]。因此, 对生物样品中这些痕量金属元素进行检测具有重要意义。

细胞是组成生命体的单元, 细胞中痕量金属元素的定量属于金属组学的一个重要研究主题^[10]。细胞中金属元素的定性/定量结果能提供大量关于金属元素的生物相容性、毒性、致癌性和诱变性等相关信息^[11]。用于金属元素检测的方法有原子吸收光谱(AAS)、电感耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)、电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)等, 其中 ICP-MS 不但具有多元素同时检测的优势, 还具有较高的灵敏度和很宽的线性范围, 但将 ICP-MS 直接用于细胞样品分析, 仍然面临基质复杂、目标元素低于检出限等问题, 如果将细胞样品进行酸消解则会引入较高的酸空白, 因此在检测之前还需对样品进行适当前处理。在多种样品前处理方法中, 聚合物整体柱毛细管微萃取(CME)具有制备简单、消耗样品量少、抗干扰能力强和易与多种检测仪器联用等优点, 适用于基质复杂、金属元素含量少的细胞样品分析。

为了改善整体柱对目标分析物的萃取效果, 常常需要对其进行改性。近年来, 纳米粒子由于粒径小、比表面积大, 具有量子效应和表面效应等许多特殊性质, 在聚合物整体柱改性方面展现出巨大的应用潜力。其中, 纳米金(Au NPs)改性的聚合物整体柱, 基于 Au NPs 与巯基的高度亲和性, 被广泛用于蛋白质和多肽的分离。例如, Svec 等^[12]制备了 Au NPs 改性的 poly(GMA-EDMA)整体柱, 并以 Au NPs 为中间桥梁, 采用一端含巯基、一端含所需功能基的改性试剂对整体柱进行修饰, 相继得到末端含—OH、—COOH、—NH₂等不同功能基的整体柱, 在不同色谱模式下实现了多种蛋白的分离。张玉奎课题组^[13]制备了 Au NPs 改性的 poly(GMA-PEGDA)亲水性整体柱, 在其表面修饰巯基苯硼酸(MPBA)和巯基乙胺(MPA), 从而可实现对糖蛋白的选择性富集, 该整体柱被成功用于血浆中糖蛋白的分析。通过在 Au NPs 表面修饰上对金属离子具有选择性的功能基, 可以拓展 Au NPs 改性的聚合物整体柱在无机金属元素分析方面的应用。实现金属离子萃取常用的功能基有巯基、氨基和羧基等, 本课题组此前分别采用单一氨基、单一羧基功能化改性整体柱, 实现了生物样品中部分痕量金属元素的检测^[14-15], 但仅依靠单一氨基或羧基与金属离子作用时, 络合位点类型有限、结合作用力单一, 对多类过渡金属、稀土金属的广谱萃取能力不足, 吸附容量与抗基质干扰能力也存在一定局限。

L-半胱氨酸(L-Cys)是一种兼具巯基、氨基、羧基 3 种活性官能团的多功能改性试剂, 3 种基团可形成协同作用: 巯基可与 Au NPs 发生强特异性结合, 实现功能分子在整体柱表面的固定; 裸露于材料表面的氨基与羧基可同时作为络合位点, 借助配位、静电等多重作用与不同理化性质的金属离子结合, 相较于仅修饰单一氨基或羧基的改性材料, 显著提升其多元素广谱萃取性能、吸附容量与适用 pH 值范围。该试剂也曾被用于修饰 Au NPs 改性的聚合物整体柱并应用于糖肽分析^[16], 其中巯基与 Au NPs 紧密结合, 而氨基和羧基裸露在整体柱表面与目标分析物相互作用。基于此, 本研究制备了 L-Cys 改性的 poly(GMA-EDMA-Au NPs)聚合物整体柱, 使整体柱同时带有大量氨基和羧基, 利用氨基和羧基与金属离子的络合作用, 实现了对多种过渡金属元素的同时萃取, 并利用整体柱 CME 与 ICP-MS 联用技术, 对 HepG2 和 SCC-7 两种细胞样品中的多种痕量过渡金属元素进行了在线分析。本方法不仅能为金属组学研究提供高效、可靠的技术手段, 助力解析细胞内痕量元素的含量变化规律, 也为痕量元素介导的细胞毒性、致癌机制以及相关毒理学研究提供了关键数据支撑, 在生物金属分析与细胞毒理领域具备良好的应用潜力。

1 实验部分

1.1 仪器装置及工作条件

毛细管(内径约 530 μm)购于永年县锐沣色谱器件有限公司(河北, 中国); 预聚液的混合和脱气使

用 KQ5200DE 型数控超声波清洗仪(江苏昆山市超声仪器有限公司, 中国); 聚合物整体柱的合成使用 HH-6 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司, 中国); 整体材料的 EDS 表征和扫描电子显微镜(SEM)表征使用扫描电镜 X-650(Hitachi 公司, 东京, 日本)和蔡司 Sigma 场发射扫描电镜(Carl Zeiss, 德国); 溶液 pH 值的调节使用 Mettler Toledo 320-S pH 计(上海 Mettler Toledo 仪器有限公司, 中国); 在线分离富集样品使用 IFIS-C 型流动注射仪(西安瑞迈电子科技有限公司); 目标元素的测定采用 Agilent7500a 电感耦合等离子体质谱仪(Agilent, Japan), 仪器的工作条件列于表 1。

表 1 ICP-MS 操作参数

Table 1 Operating conditions of ICP-MS

ICP-MS plasma	Value
Rf power	1 250 W
Plasma gas(Ar) flow rate	14 L·min ⁻¹
Auxiliary gas(Ar) flow rate	0.88 L·min ⁻¹
Carrier gas(Ar) flow rate	1.07 L·min ⁻¹
Sampling depth	7.0 mm
Sampler/skimmer diameter orifice	Nickel 1.0 mm/0.4 mm
Scanning mode	Peak-hopping
Dwell time	50 ms
Integration mode	Peak area
Isotopes	⁵¹ V, ⁶⁵ Cu, ⁶⁹ Ga, ⁸⁹ Y, ¹¹⁵ In, ¹¹⁸ Sn, ¹⁴⁰ Ce, ¹⁵³ Eu, ¹⁶³ Dy, ¹⁶⁹ Tm, ²⁰⁸ Pb, ²⁰⁹ Bi

1.2 试剂和标准溶液

V、Cu、Ga、Y、In、Ce、Eu、Dy、Tm、Pb 和 Bi 的标准储备液分别由 NH₄VO₃、Cu(NO₃)₂、Ga(NO₃)₃、Y(NO₃)₃、金属 In、Ce(NO₃)₃、Eu(NO₃)₃、Dy(NO₃)₃、Tm(NO₃)₃、Pb(NO₃)₂ 和 Bi(NO₃)₃ 溶于 2%(体积分数, 下同)的硝酸配制而成, Sn 的标准储备液由 SnCl₄ 溶于 1:1(体积比)盐酸后再用 1:9(体积比)的盐酸稀释而成, 工作曲线溶液和混合金属离子溶液均由标准储备液逐级稀释而成。干扰元素储备液(K⁺、Na⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺)均以 2% HNO₃ 溶解相应的硝酸盐或盐酸盐配制而成, 阴离子均以其相应的钠盐或钾盐溶于高纯水配制而成。

3-(三甲氧基甲硅烷基)甲基丙烯酸丙酯(WD-70)购于武大有机硅有限责任公司, 引发剂偶氮二异丁腈(AIBN)、单体甲基丙烯酸缩水甘油酯(GMA)、交联剂乙二醇二甲基丙烯酸酯(EDMA)和改性试剂 L-半胱氨酸购于 Aladdin 公司, 胱胺二盐酸盐购于 Sigma 公司, 二硫苏糖醇(DTT)购于国药试剂有限公司, 其它试剂亦为分析纯或分析纯以上级别; 实验中溶液配制所用水均为高纯水, 由超纯水仪 Milli-Q Element System(18.2 MΩ·cm, Mollipore, Molsheim, France)提供。

1.3 毛细管整体柱的制备

整体柱的制备过程如图 1 所示, Au NPs 改性 poly(GMA-co-EDMA)整体柱的制备和 Au NPs 的合成如下所述。

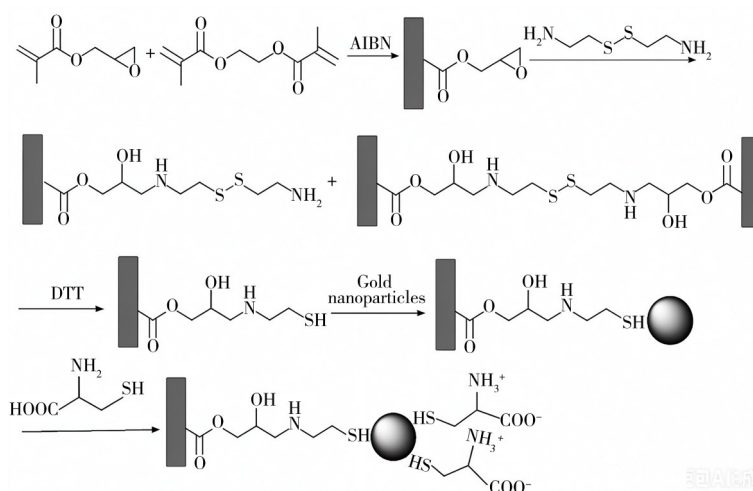


图 1 聚合物整体柱的制备流程示意图

Fig. 1 Scheme of the preparation procedure of the polymer monolithic column

15 nm Au NPs 的制备参考文献[17]。首先配制新鲜的王水,对两口烧瓶和瓶塞进行浸泡;洗净后,在 49.5 mL 水中加入 0.5 mL 1% 的 HAuCl_4 , 加热至沸;继续加入 1.5 mL 1% 的柠檬酸钠水溶液,搅拌反应 15 min;关闭热源,继续搅拌至室温。将制备得到的 Au NPs 于 4 °C 保存。

毛细管聚合物 poly(GMA-co-EDMA) 整体柱的制备参考本课题组之前的工作^[18]。先将毛细管进行活化:按照乙醇、水、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 、水、 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ 、水和乙醇的顺序依次对毛细管进行冲洗,冲洗时间分别为 10 min、10 min、2 h、30 min、2 h、30 min 和 10 min,再用惰性气体吹干。将体积比为 1:1 的 WD-70 与乙醇混合溶液泵入毛细管内,两端用硅胶封口,置于 70 °C 烘箱内 12 h,然后用乙醇将毛细管内未反应的试剂清洗干净,再用惰性气体将毛细管吹干备用。

采用热引发原位聚合法合成整体柱,预聚液由 14% GMA、12% EDMA、65% 环己醇、8% 正十二烷醇和 1% AIBN(均为质量分数)组成,将混合液超声 15 min 使溶液混匀并排出气泡。然后用注射器将预聚液注入已活化的毛细管中,两端用橡胶封口,置于 60 °C 水浴锅反应 12 h。聚合反应完成后,切掉毛细管两端的死体积,再用乙醇依次以 1、2、5、10 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速冲洗毛细管,以除去未反应的单体和致孔剂。

Au NPs 改性 poly(GMA-co-EDMA) 整体柱的制备:先后用脲胺、丙胺和二硫苏糖醇对 poly(GMA-co-EDMA) 整体柱进行改性,使其表面修饰上丰富的巯基,再将合成好的 Au NPs (~15 nm) 通入整体柱,待 Au NPs 负载饱和(即流出液变粉红)后,将 0.5 mol/L L-Cys 溶于 0.5 mol/L 的 HNO_3 , 使用流动注射仪以 50 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 的流速连续通入整体柱中,持续改性 2 h 后,用超纯水将柱子冲洗至中性,备用。

1.4 细胞样品处理

将 HepG2 细胞和 SCC-7 细胞分别收集于尖头 EP 管中,在 1 500 r/min 转速下离心 5 min 使细胞沉于 EP 管尖端,弃去上清液,加入 PBS 缓冲液对细胞样品进行清洗(即用移液枪反复将细胞吹散),随后再次以 1 500 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,重复清洗 1 次,以将残留在细胞样品中的培养基去除干净。采用血球计数板法完成细胞计数:取混匀后的细胞悬液滴加至计数板,显微镜下统计有效方格内的细胞数量,换算得到细胞浓度。

对细胞进行计数之后,将收集到的细胞用 PBS 缓冲液稀释至合适密度。随后采用超声波清洗仪(整机额定超声功率 200 W,工作频率 40 kHz)进行超声破膜处理:设置水浴温度 25 °C,连续超声 30 min;破膜完成后,于 12 000 r/min 条件下离心 5 min,细胞碎片沉积于管底,吸取上清液,调节 pH 值后即可进行萃取实验。

对相同细胞密度的破膜液进行加标回收实验,其中 Cu 加标水平为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,其它元素加标水平为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 聚合物毛细管整体柱表征

为观察所制备的毛细管整体柱的材料形貌,用石英割片将其沿横截面切开,采用 SEM 进行表征。图 2 为不同放大倍数下横截面的扫描电镜图,由图可见材料与毛细管内壁结合紧密,没有脱壁现象(图 2A、B),柱床内部结构均匀,由大小均一的微球以及相互贯穿的孔结构组成(图 2C),AuNPs 颗粒均匀密集地结合在整体柱材料表面(图 2D)。

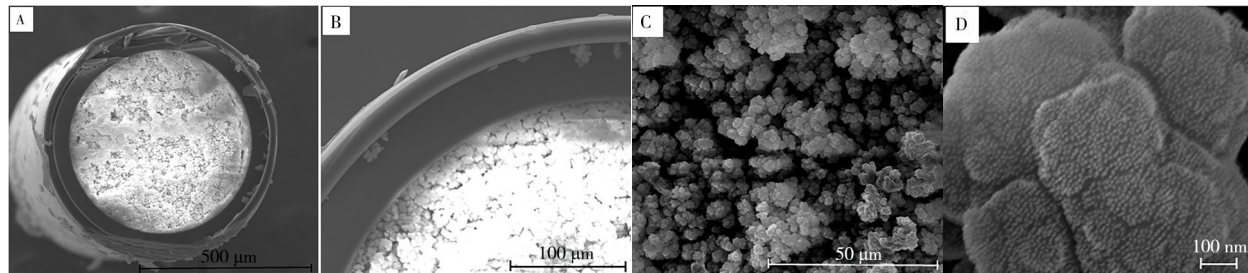


图 2 聚合物整体毛细管横截面的扫描电镜图

Fig. 2 SEM images of the cross section of the polymer monolithic capillary

A. $\times 150$, B. $\times 500$, C. $\times 1\,500$, D. $\times 80\,000$

Au NPs 改性后整体柱由浅黄色变成深红色, 对其横截面进行 EDS 能谱表征, 结果如图 3 所示, 图中可看到明显的 Au 元素信号峰, Au 的质量分数高达 30.3%, 说明整体柱表面覆盖了大量 Au NPs 颗粒。

为了验证整体柱表面改性情况, 对 *L*-Cys 改性前后的整体柱进行红外光谱表征, 结果如图 4 所示。*L*-Cys 改性前后整体柱功能基的出峰位置相同, 其中 $3\,440\text{ cm}^{-1}$ 处为 —OH 的伸缩振动, $1\,727\text{ cm}^{-1}$ 处为 C=O 的伸缩振动, $1\,151\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—O 的伸缩振动, 900 cm^{-1} 处为 —OH 的面外变形振动, 说明 *L*-Cys 改性前后 poly(GMA-EDMA-Au NPs) 整体柱上有羧基存在; $1\,639\text{ cm}^{-1}$ 处为 N—H 面内弯曲振动, $1\,262\text{ cm}^{-1}$ 处为 C—N 伸缩振动, 说明 *L*-Cys 改性前后 poly(GMA-EDMA-Au NPs) 整体柱上有氨基存在。

利用 DTNB 显色反应对整体柱上的半胱氨酸进行定量^[19], Au NPs 改性前整体柱上巯基的含量为 $0.01 \times 10^{-3}\text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$, 连接 Au NPs 之后, 改性修饰上的半胱氨酸的量为 $4.80 \times 10^{-3}\text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$, 其中半胱氨酸的巯基与 Au NPs 结合, 而氨基和羧基裸露在表面, 即整体柱表面羧基和氨基的量均为 $4.8 \times 10^{-3}\text{ mmol} \cdot \text{cm}^{-1}$, 说明 Au NPs 的桥连作用使得整体柱表面的功能基数量得到显著增加。

2.2 pH 值的影响

考察了不同 pH 值条件下, 整体柱对目标元素的吸附行为, 结果如图 5 所示。可以看到, 除 V 外, 目标元素在 pH 4.0~8.0 范围均可实现定量吸附。参考表 2 中甘氨酸、乙酸与金属元素的络合稳定常数^[20], 可以推测该整体柱对目标元素的吸附主要基于氨基和羧基对目标元素的络合作用。对于元素 V, pH 8.0 时, 吸附效率出现下降趋势, 可能原因是储备液中的 V 以 VO_3^- 阴离子形式存在, 而半胱氨酸的 $\text{p}K_{a1}=1.71$, $\text{p}K_{a2}=8.39$, 当溶液的 $\text{pH} > \text{p}K_{a2}$ 时, 半胱氨酸主要以带一个负电荷的阴离子形式存在, 因此在偏碱性条件下, 整体柱表面的负电荷较多, 与 VO_3^- 产生静电排斥作用, 导致不能定量吸附。考虑到金属元素在较高 pH 值条件下的水解情况, 后续实验选择 pH 5.0 为上样条件。

2.3 上样流速的影响

固定上样体积为 0.5 mL, 考察了上样流速对整体柱吸附行为的影响。通过改变流动注射仪蠕动泵的转速控制上样流速分别为 25、35、50、80、100、120 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 结果显示, 在所考察的流速范围内, 该整体柱均可实现对目标元素的定量吸附, 但当流速大于 $120\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 柱压过大, 故后续实验选择样品溶液流速为 $100\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.4 解吸剂浓度和体积的考察

由于该整体柱对目标元素的吸附主要基于氨基和羧基对金属元素的络合作用, 而强酸可以破坏这种作用力, 故采用不同浓度的酸考察了目标元素的解吸行为。依次考察了 0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸对目标离子回收率的影响。结果显示, 当硝酸浓度大于 $1.0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 目标离子的回收

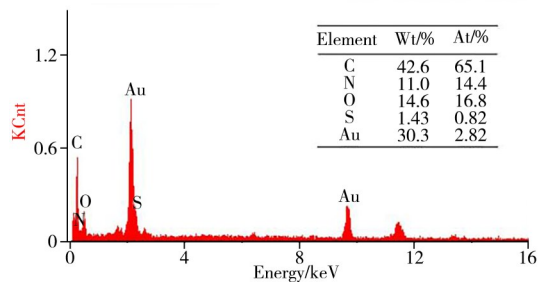


图 3 纳米金改性聚合物整体柱的 EDS 能谱图

Fig. 3 EDS of the Au NPs modified polymer monolith

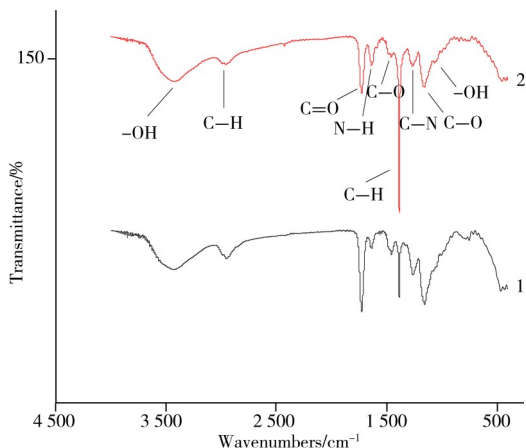


图 4 poly(GMA-EDMA-Au NPs) (曲线 1) 与 poly(GMA-EDMA-Au NPs-L-Cys) (曲线 2) 整体柱的红外光谱图

Fig. 4 IR of the poly(GMA-EDMA-Au NPs) (curve 1) and poly(GMA-EDMA-Au NPs-L-Cys) (curve 2) monolith

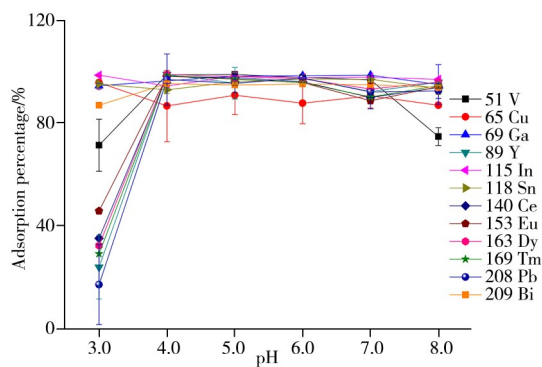


图 5 pH 值对目标物吸附率的影响

Fig. 5 Effect of pH on the adsorption percentage of all the target elements

experimental conditions: $\rho=10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; sample volume: 0.5 mL; sample flow rate: $100\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (实验条件: $\rho=10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; 上样体积 0.5 mL; 上样流速 $100\text{ }\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)

率均可达 85% 以上, 考虑到仪器的耐酸能力以及洗脱体积, 最终选择的硝酸浓度为 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

采用 $25 \text{ } \mu\text{L}$ $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸对吸附了目标离子的整体柱连续进行 4 次解吸, 考察了洗脱剂体积对回收率的影响。结果表明, 前两次解吸的回收率之和即可达到对目标离子的定量回收, 故后续实验使用 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸进行解吸。

表 2 配合物累积稳定常数^[20]

Table 2 The accumulated formation constant of complex^[20]

Ligand	Metal ion	$\lg K_1$	$\lg \beta_2$	$\lg \beta_3$	$\lg \beta_4$
$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Cu^{2+}	8.60	15.54	16.27	
	Pb^{2+}	5.47	8.92		
	Dy^{3+}		12.2		
	Er^{3+}		12.7		
	Y^{3+}		12.5		
CH_3COOH	Cu^{2+}	2.16	3.20		
	In^{3+}	3.50	5.95	7.90	9.08
	Y^{3+}	1.53	2.65	3.38	
	Sn^{2+}	3.3	6.0	7.3	
	Pb^{2+}	2.52	4.0	6.4	8.5

2.5 样品体积的优化

考察了样品溶液的体积对目标离子回收率的影响, 固定各金属元素的量为 5 ng , 分别选取 0.1 、 0.5 、 1.0 、 2.0 mL 的样品溶液上样, 用 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸进行解吸。结果显示, 在考察范围内, 所有目标分析物的回收率均大于 85%。综合考虑分析时间和富集倍数, 选择上样体积为 0.5 mL , 此时的上样时间为 5 min , 理论富集倍数为 10 倍, 样品通量为 10 h^{-1} 。

2.6 抗干扰性考察

在最优实验条件下, 对几种常见的干扰离子进行考察, 将不同量的干扰离子分别加入 0.5 mL $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 目标离子的样品溶液中, 所得各离子的最大允许量(使目标离子的回收率保持在 85%~115% 的最大共存离子浓度)见表 3。

表 3 干扰离子对目标元素的影响

Table 3 Effect of interfering ions on the determination of the target elements

Coexisting ion	Tolerance limit/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
Na^+	6 670
K^+	5 000
Mg^{2+}	400
Ca^{2+}	400
Zn^{2+}	10
Fe^{3+}	10
Cl^-	10 000
H_2PO_4^-	1 000
SO_4^{2-}	2 000
NO_3^-	15 000

2.7 分析性能考察

2.7.1 吸附容量 在 12 种目标元素中选择 5 种进行整体柱吸附容量考察, 结果发现, Eu 、 V 、 In 、 Pb 和 Bi 在该整体柱上的吸附容量分别为 380 、 475 、 480 、 585 、 $415 \text{ } \mu\text{g}/\text{m}$; 细胞样品中目标金属含量极低, 单次上样总金属含量为纳克级, 远低于该整体柱的饱和容量, 批量检测不会出现吸附饱和、回收率下降问题, 满足分析需求。

2.7.2 制备重现性、再生性和使用寿命 在最优实验条件下考察了同一批次中 11 根柱子及 3 个批次中 9 根柱子对目标元素的萃取回收率, 并计算相对标准偏差(RSD), 结果发现, 该自制整体柱的批内重现性为 2.1% ~ 6.1% , 批间重现性为 2.4% ~ 8.0% , 说明该整体柱的制备重现性良好。

材料的再生性是衡量毛细管整体柱性能的重要指标, 本实验采用 $50 \text{ } \mu\text{L}$ $1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HNO_3 对整体柱进行冲洗即可除去残存于毛细管中的微量金属离子以消除记忆效应, 随后用 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 缓冲溶液和高纯水将其平衡至中性即可重复使用。在保证定量回收的前提下, 该整体柱可重复使用 120 次以上, 说明其稳定性良好。

2.7.3 检出限与精密度 在最优实验条件下, 对本方法的分析性能进行考察, 结果如表 4 所示。本方法采用 3 倍标准偏差/工作曲线斜率得到检出限为 $0.45(\text{Eu})$ ~ $15.4(\text{Cu}) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 精密密度为 3.0% ~ 9.3% , 方法的线性范围为 0.002 ~ $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 线性相关系数均大于 0.99。

将本方法的分析性能与文献进行比较, 结果如表 5 所示。可以看出, 本方法可以同时检测多种金属元素且检出限处于中等水平。与文献[21~23]相比, 本方法所消耗的样品体积非常小, 适用于珍贵

生物样品的分析检测；与[22-23]相比，本方法可实现在线分析，减小实验误差，提高准确度；与文献[24-25]所使用的涂层毛细管相比，本方法所使用的 Au NPs 改性的聚合物整体柱对金属元素的吸附容量更大；与同样以细胞样品为研究对象的[26-28]相比，本方法的检出限较低，可进行在线分析且具有较高的样品通量。另外，根据细胞计数结果，本方法每个样品所消耗的 HepG2 细胞数为 30 000 个，SCC-7 细胞细胞数为 100 000 个，与文献[28]中芯片磁固相萃取消耗的细胞量(每个样品 60 000 个 HepG2 细胞，300 000 个 Jurkat T 细胞，80 000 个 MCF-7 细胞)相当。

表 4 优化条件下纳米金改性整体毛细管用于痕量过渡金属元素分析的性能

Table 4 Analytical performance of Au NPs modified monolithic capillary for the analysis of trace transition metal elements under optimized conditions

Elements	LODs/(ng·L ⁻¹)	RSD/%	Linear range/(μg·L ⁻¹)	Equation	r ²
V	2.73	3.4 ^a	0.005~20	y=78 862x+4 147	0.998 9
Cu	15.4	7.8 ^b	0.05~20	y=47 584x+17 911	0.997 1
Ga	1.90	6.8 ^a	0.005~20	y=59 290x+983	0.998 0
Y	0.86	6.1 ^a	0.002~20	y=131 774x+16 569	0.997 9
In	1.50	9.3 ^a	0.005~20	y=91 761x+13 612	0.997 7
Sn	5.74	6.1 ^b	0.02~20	y=52 595x-4 532	0.997 8
Ce	0.60	3.0 ^a	0.002~20	y=178 908x-1 105	0.995 6
Eu	0.45	7.4 ^a	0.001~20	y=110 846x+10 431	0.996 9
Dy	0.86	7.5 ^a	0.002~20	y=58 140x+8 101	0.998 0
Tm	0.52	9.1 ^a	0.002~20	y=210 448x+15 665	0.995 9
Pb	7.68	4.3 ^b	0.02~20	y=110 829x+46 061	0.999 5
Bi	1.93	9.1 ^a	0.005~20	y=119 765x-3 352	0.998 5

a: $\rho=10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, b: $\rho=100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$

表 5 本文方法与其他方法测定目标元素的分析性能对比

Table 5 Comparison of analytical performance of the proposed method with other methods for the determination of target elements

Adsorbent	Method	Element	Enrichment factor	Detection limits/(ng·L ⁻¹)	Through-put/(h ⁻¹)	On/off-line	Sample volume/mL	Sample	Ref.
MWCNTs-IDA	SPE-ICP-MS	V, Cr, Pb, Co, Cu, As, Cd	66~101	1.3, 1.2, 0.7, 0.4, 2.5, 3.4, 0.79	—	On line	15	Fish, shrimp, scallop	[21]
S-CS-MW-CNTs ^a	SPE-ICP-MS	V, Cr, Cu, As, Pb	52~128	2.1, 3.8, 3.5, 1.3, 3.6	—	Off line	20	Herring, spinach, river water and tap water	[22]
IDA-GMA-EDMA	SPME-ICP-MS	Ti, Fe, Co, Ni, Cu, Ga, Cd, Sn, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu	55.6	0.3, 180, 0.9, 6.0, 15, 0.01, 0.09, 1.5, 0.9, 0.24, 0.015, 0.027, 0.012, 0.009, 0.015, 0.009, 0.012, 0.003, 0.0012, 0.009, 0.027, 0.012	—	Off line	50	River water	[23]
ZrO ₂ -silica	CME-ICP-MS	Cr, Cu, Cd, Pb	6.25	9.9, 17.9, 4.5, 3.7	8	On line	1.25	Human urine	[25]
AAPTS-silica	CME-ICP-MS	Cu, Zn, Ni, Hg, Cd	12.5	1.8, 11.8, 1.1, 3.3, 1.4	14	On line	1	Human hair, serum and urine	[24]
APTES-silica	CME-ICP-MS	Mn, Co, Ni, Cu, Cd, Pb	20	6.2, 1.5, 5.2, 6.3, 1.2, 14	—	—	1	Human hair and urine	[29]
GO-silica composite	HF-SPME-ICP-MS	Mn, Co, Ni, Cu, Cd, Pb	10	7.5, 0.39, 20, 23, 6.7, 28	8	On line	1	Environmental water	[30]
γ-MPTS modified silica-coated MNPs	Chip-based MSPME-ETV-ICP-MS	Cd, Pb, Hg	50	0.72, 1.12, 0.86	—	Off line	0.5	HepG2 cell	[27]
APTES modified MNPs	Chip-based array MSPME-ICP-MS	Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Bi	59~69	49, 43, 4.2, 6.1, 13, 18	5	On line	0.5	HepG2 cell, Jurkat T cell, MCF 7 cell	[28]

(续表 5)

Adsorbent	Method	Element	Enrichment factor	Detection limits/(ng·L ⁻¹)	Through-put/(h ⁻¹)	On/off-line	Sample volume/mL	Sample	Ref.
GMA-TRIM-NH ₂	Chip-based MME-ICP-MS	Bi	3.3	210	—	Off line	0.1	HepG2 cell	[26]
GMA-EDMA-Au-Cys	CME-ICP-MS	V, Cu, Ga, In, Sn, Pb, Bi, Y, Ce, Eu, Dy, Tm	10	2.73, 15.4, 1.90, 0.86, 1.50, 5.74, 0.60, 0.45, 0.86, 0.52, 7.68, 1.93	10	On-line	0.5	HepG2 cell SCC-7 cell	This work

a: Schiff base-chitosan grafted multiwalled carbon nanotubes

2.8 细胞样品分析

将本方法用于 HepG2 肝癌细胞和 SCC-7 皮肤癌细胞中金属元素的含量分析, 结果如表 6、表 7 所示, 细胞中各金属元素的含量处于飞克和亚飞克水平。为验证本方法能够耐受细胞超声破膜离心后上清液基质的干扰, 对两种细胞进行加标回收实验, 其中 Cu 加标水平为 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其它元素加标水平为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。计算得到 HepG2 细胞的加标回收率为 89.1%~112%, SCC-7 细胞的加标回收率为 85.4%~114%。

表 6 目标元素在 HepG2 细胞破膜液中的分析结果(平均值±标准偏差, $n=3$)
Table 6 Analytical results of target elements in HepG2 cells extracts(mean±sd, $n=3$)

Element	Found ^a /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Average ^b /(fg·cell ⁻¹)	Found/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%
V	0.005±0.001	0.083±0.012	0.499±0.067 ^c	98.9
Cu	2.027±0.185	33.78±3.088	7.561±0.233 ^d	108
Ga	0.030±0.003	0.502±0.047	0.541±0.031 ^c	102
Y	0.002±0.001	0.041±0.013	0.490±0.007 ^c	97.4
In	N. D.	N. D.	0.511±0.018 ^c	102
Sn	0.061±0.010	1.025±0.170	0.525±0.008 ^c	93.4
Ce	0.006±0.001	0.096±0.017	0.569±0.023 ^c	112
Eu	0.009±0.001	0.142±0.019	0.473±0.008 ^c	93.1
Dy	0.005±0.001	0.083±0.017	0.454±0.00 ^c	89.8
Tm	0.003±0.001	0.058±0.011	0.517±0.041 ^c	103
Pb	0.058±0.010	0.975±0.169	0.542±0.041 ^c	97.1
Bi	0.356±0.011	5.93±0.177	0.762±0.045 ^c	89.1

N. D.: not detected; a: determined value for target elements in 30 000 cells, b: content of target elements in one cell, calculated by dividing the determined value(Found^a) with cells number(30 000), c: 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of target element was spiked into 30 000 cells, d: 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of target element was spiked into 30 000 cells

表 6 目标元素在 SCC-7 细胞破膜液中的分析结果(平均值±标准偏差, $n=3$)
Table 6 Analytical results of target elements in SCC-7 cells extracts(mean±sd, $n=3$)

Element	Found ^a /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Average ^b /(fg·cell ⁻¹)	Found/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%
V	0.007±0.001	0.035±0.005	0.523±0.028 ^c	103
Cu	2.904±0.136	14.52±0.68	6.752±0.206 ^d	85.4
Ga	0.031±0.001	0.157±0.006	0.554±0.042 ^c	104
Y	0.013±0.000 4	0.065±0.002	0.485±0.030 ^c	94.6
In	0.004±0.000 5	0.021±0.003	0.499±0.061 ^c	99.1
Sn	0.010±0.001 6	0.052±0.008	0.492±0.022 ^c	96.4
Ce	0.019±0.002	0.097±0.010	0.484±0.018 ^c	93.2
Eu	0.007±0.000 0	0.034±0.000	0.547±0.046 ^c	108
Dy	0.007±0.000 6	0.037±0.003	0.531±0.049 ^c	105
Tm	0.007±0.000 6	0.037±0.003	0.577±0.008 ^c	114
Pb	0.067±0.000 7	0.335±0.004	0.542±0.026 ^c	95.6
Bi	0.058±0.003 0	0.290±0.014	0.541±0.013 ^c	96.9

a: determined value for target elements in 100 000 cells, b: content of target elements in one cell, calculated by dividing the determined value(Found^a) with cells number(100 000), c: 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of target element was spiked into 100 000 cells, d: 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of target element was spiked into 100 000 cells

3 结 论

本工作利用巯基与 Au NPs 之间的强亲和作用, 采用 L-Cys 在 poly(GMA-EDMA-Au NPs)整体柱表

面同时修饰氨基和羧基, 基于氨基和羧基与金属离子之间的络合作用, 建立了 CME 与 ICP-MS 联用对细胞中多种金属元素进行同时检测的新方法。本方法不需对细胞样品进行消解, 细胞经超声破膜之后可直接萃取分析, 简化了细胞处理过程。

本文制备的 Au NPs 改性聚合物整体柱成本低、使用寿命长, 可重复使用 120 次以上, 有效降低了实验耗材成本; 克服了传统离线固相萃取、芯片磁固相萃取等技术操作繁琐、人工干预多, 分析通量有限, 部分涂层毛细管、常规固相萃取材料吸附容量低、柱体易损耗、复用性差等问题。本方法在线分析过程误差小, 样品通量为 10 h^{-1} , 分析效率显著优于多数离线检测方法。同时该方法检出限低、所需细胞样本用量少, 适配珍贵细胞样品的分析需求, 拓展了 Au NPs 改性聚合物整体柱毛细管微萃取技术在细胞样品金属分析领域的应用场景, 可为细胞金属组学、金属毒理学相关研究提供高效技术支持。

参考文献:

- [1] Domingo J L. *Reprod. Toxicol.*, **1996**, 10(2): 175-182.
- [2] Malandrinos G, Hadjiliadis N. *Coord. Chem. Rev.*, **2014**, 262: 55-71.
- [3] Chang K L, Liao W T, Yu C L, Lan C C E, Chang L W, Yu H S. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **2003**, 193(2): 209-217.
- [4] Asakura K, Satoh H, Chiba M, Okamoto M, Serizawa K, Nakano M, Omae K. *J. Occup. Health*, **2008**, 50(5): 471-479.
- [5] Sun L H, Zhang N Y, Zhai Q H, Gao X, Li C, Zheng Q, Krumm C S, Qi D. *Biol. Trace Elem. Res.*, **2014**, 162(1/3): 302-308.
- [6] Kirberger M, Wong H C, Jiang J, Yang J J. *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, 125: 40-49.
- [7] Yang Y, Ouyang R Z, Xu L, Guo N, Li W, Feng K, Ouyang L, Yang Z, Zhou S, Miao Y. *J. Coord. Chem.*, **2015**, 68(3): 379-397.
- [8] Recklinghausen U V, Hartmann L M, Rabieh S, Hippler J, Hirner A V, Rettenmeier A W, Dopp E. *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, 21(6): 1219-1228.
- [9] Chen Z Y. *Rural Eco-Environ.*, **2005**, 21(4): 72-73, 80.
- [10] Haraguchi H. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2004**, 19(1): 5-14.
- [11] Lobinski R. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **2001**, 369(1/2): 113-114.
- [12] Cao Q, Xu Y, Liu F, Svec F, Fréchet J M J. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(17): 7416-7421.
- [13] Wu C, Liang Y, Zhao Q, Qu Y Y, Zhang S, Wu Q, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Chemistry*, **2014**, 20(27): 8737-8743.
- [14] Zhang L, Chen B B, Peng H Y, He M, Hu B. *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34(16): 2247-2254.
- [15] Zhang L, Chen B B, He M, Hu B. *J. Sep. Sci.*, **2013**, 36(13): 2158-2167.
- [16] Liang Y, Wu C, Zhao Q, Wu Q, Jiang B, Weng Y J, Liang Z, Zhang L H, Zhang Y K. *Anal. Chim. Acta*, **2015**, 900: 83-89.
- [17] Yuan S, Liu Z, Ma S. *Mater. Rev.*, **2012**, 26: 52-58.
- [18] Liu X L, He M, Chen B B, Hu B. *Spectrochim. Acta B*, **2014**, 101: 254-260.
- [19] Sinha A, Jana N R. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(72): 9272-9274.
- [20] Zhou T H, Wang E K, Lu W Z. *Handbook of Analytical Chemistry*. 1st ed. Beijing: Chemical Industry Press (周同惠, 汪尔康, 陆婉珍. 分析化学手册. 第1版. 北京: 化学工业出版社), **1996**: 160, 168.
- [21] Wang J P, Ma X X, Fang G Z, Pan M F, Yu X K, Wang S. *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 186(2/3): 1985-1992.
- [22] Dai B Y, Cao M R, Fang G Z, Liu B, Dong X, Pan M F, Wang S. *J. Hazard. Mater.*, **2012**, 219/220: 103-110.
- [23] Rahmi D, Takasaki Y, Zhu Y, Kobayashi H, Konagaya S, Haraguchi H, Umemura T. *Talanta*, **2010**, 81(4/5): 1438-1445.
- [24] Zheng F, Hu B. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 605(1): 1-10.
- [25] Wu Y W, Hu B, Jiang Z C, Feng Y Q, Lu P, Li B Y Z. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20(22): 3527-3534.
- [26] Zhang J, Chen B B, Wang H, Huang X, He M, Hu B. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2016**, 31(7): 1391-1399.
- [27] Chen B B, Heng S J, Peng H Y, Hu B, Yu X, Zhang Z L, Pang D W, Yue X, Zhu Y. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **2010**, 25(12): 1931-1938.
- [28] Wang H, Wu Z K, Chen B B, He M, Hu B. *Analyst*, **2015**, 140(16): 5619-5626.
- [29] Zhang L, Chen B B, Peng H Y, He M, Hu B. *J. Sep. Sci.*, **2011**, 34(16): 2247-2254.
- [30] Su S W, Chen B B, He M, Hu B. *Talanta*, **2014**, 123: 1-9.

(责任编辑: 盛文彦)