

石墨炉原子吸收光谱法测定血清中非蛋白结合铜和锌

张源, 林哲绚, 李伟秋, 张俏忻, 李慧, 罗红军, 罗文鸿*

汕头大学医学院中心实验室, 广东 汕头 515041

摘要 建立两步沉淀蛋白质-石墨炉原子吸收法测定血清中非蛋白结合铜和锌的方法。无水乙醇以2:1与血清混合后,再经70℃温度变性处理,可将蛋白质完全沉降。用氘灯校正背景,石墨炉原子吸收法进行测定,方法检测限: Cu, $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Zn, $0.098 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。回收率: Cu, 92.3%~104%, Zn, 为90%~107%。利用此方法测定了肿瘤患者血清中游离铜与锌,并与健康人作了对比。

关键词 铜; 锌; GFAAS; 蛋白质沉淀

中图分类号: O657.3 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)10-2864-03

引言

由于锌、铜等微量元素代谢紊乱与冠心病、肝硬化、糖尿病、肿瘤等疾病关系密切所以测定人血和组织中的铜和锌在医学诊疗中非常重要^[1]。在临床分析中,一般以总铜和总锌的含量作为健康或疾病的医学诊断指标。微量元素的生物活性或毒性主要取决于它在人体血清内存在的化学形态,用总量不足以说明体内微量元素与各种异常症状的内在联系。肝豆状核变性患者就是因为体内血清铜蓝蛋白结合铜离子能力差,从而导致血中游离铜增多,以致引起体内器官蓄积浓度增加,对脏器造成损害,导致神经系统或精神的异常^[2]。所以,了解血清中非蛋白结合铜和锌水平,可以帮助我们获得不同疾病患者不同形态铜和锌在体内更多的信息,加深对铜和锌代谢异常机制的了解。

目前报道测定血清游离铜和锌的方法甚少。采用超滤膜(20 kDa)滤掉分子量较大的蛋白质,可以实现在超滤液中测定游离铜离子水平^[3]。另一种方法是将蛋白质吸收在一种塑料聚合物表面,通过固相萃取分离后测定游离金属离子水平^[4]。但上述两种方法,条件不易控制,影响因素太多。考虑到蛋白质可以通过变性沉淀除去,我们建立了两步沉淀蛋白质-石墨炉原子吸收法测定血清非蛋白结合铜和锌的方法。本方法操作简单,条件很容易控制,测定结果重现性好,可大批量测定样本。

作者曾试验硫酸铵饱和和沉淀法去蛋白质,发现蛋白质去除率不理想,且溶液盐分太大,石墨管加热时会喷出大量烟

雾,严重污染环境和产生基体干扰。本文选用乙醇与血清2:1体积比混合,经70℃温度处理,通过低温超速离心后,蛋白质沉降率能达99.8%。沉降后离心得到的清液用石墨炉原子吸收法测定,结果令人满意。且乙醇是易挥发性的物质,不会对测定带来干扰。

1 实验部分

1.1 仪器及工作条件

AA-660型原子吸收分光光度计(日本岛津),GFA-4B石墨炉原子化器,ASC-60G自动进样器。铜、锌空心阴极灯,波长324.8和213.9 nm,工作电流10 mA,狭缝宽0.5 nm,BGC-D2测量峰面积,10 μL 进样。美国Millipore公司超纯水器。L7-65型BECKMAN离心机。Eppendorf微量移液管。酶标仪(Thermolabsystems公司,芬兰)。

石墨炉工作条件:(1)干燥,Cu和Zn,100℃升温30 s。(2)灰化,Cu,500℃恒温25 s,Zn,350℃恒温30 s。(3)原子化,Cu 2 300℃恒温4 s,停止内气流。Zn 1 300℃恒温4 s,内气流 $1.5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.2 标准溶液及试剂

将浓度为 $1.000 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu和Zn的标准贮备液(国家钢铁材料中心,10% HCl)用70%(φ)乙醇分别稀释成0.0,10,20,40,80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和0.0,5,10,20,40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准系列,无水乙醇为分析纯。

正常人(体检健康者)血清和肝豆状核变性患者血清由汕头大学医学院附一医院检验科提供,肿瘤病患者血清由汕头

收稿日期:2008-05-06,修订日期:2008-08-08

基金项目:国家自然科学基金项目(30271139)和广东省自然科学基金项目(022124)资助

作者简介:张源,1963年生,汕头大学医学院分析测试室高级实验师 e-mail: yzhang@stu.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: whluo@stu.edu.cn

大学医学院附属肿瘤医院检验科提供。

1.3 样品处理

(1) 取 500 μL 的血清置于 3 000 μL 的洁净塑料管, 加 1 000 μL 的无水乙醇, 振荡后, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min。取出后上 BECKMAN 离心机在温度 4 $^{\circ}\text{C}$ 下按离心力 100 000 g 离心。从中取出 100 μL 上清液, 加 100 μL 超纯水稀释, 上机测定。另取同样品 20 μL 血清按文献[5]测定总铜和总锌。

(2) 按考马斯亮蓝法[6]分别测定血清及其血清变性沉降分离后的清液所含蛋白质浓度, 以两者浓度差去除血清蛋白质浓度计算蛋白质沉降率。

2 结果与讨论

2.1 测锌时线性范围的确定

由于锌的灵敏度很高, 线性范围窄, 且低浓度时易受污染, 参照了文献[7]除了严格控制空白值外, 并经试验确定原子化时通以内气流 1.5 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 以降低灵敏度, 线性范围可以由 0~20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 0~40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 乙醇与血清不同体积比的选择

乙醇与血清不同体积比混合后经温度处理, 离心后所得上清液铜含量测定结果与蛋白质沉降率见图 1。图 1 表明, 当血清与乙醇体积比达到 1:2 时, 沉降率有 99.8%, 而铜的吸光度降至最低, 再加大乙醇的倍数, 基本上没有多大变化。锌和铜两种元素的吸光度变化与所选的样品处理条件有类似规律, 本文只对铜元素加以讨论(以下相同)。

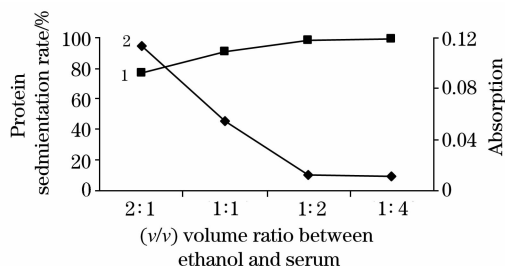


Fig. 1 The protein sedimentation rate and copper absorbance after blood serum commixture with different volume ethanol

1: Protein sedimentation rate; 2: Copper absorbance

2.2 温度及加热时间的选择

从图中可看出, 没有经过加热处理的血清经乙醇沉降后, 由于蛋白质沉降率不理想, 离心后的溶液含铜量仍然较高。考虑乙醇的挥发性, 我们选择温度 70 $^{\circ}\text{C}$ 进一步沉淀血清中的蛋白质。图 2 表明, 蛋白质沉降率在水浴 5 min 左右达到最高, 尔后稍有下降, 但铜含量在水浴 5 min 左右降到最低值, 之后基本上保持不变。

2.3 离心力对蛋白质去除率的影响

由图 3 可看出, 离心力达到 100 000 g 时, 分离得到的清液中所含铜吸光度最低, 尔后再增大离心力, 吸光度基本上

没有变化。

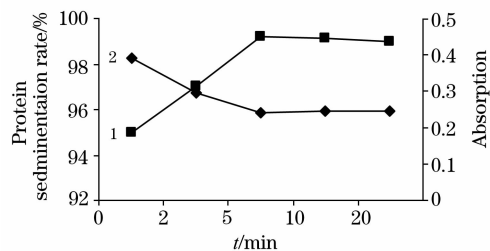


Fig. 2 The protein sedimentation rate and copper absorbance with different time at 70 $^{\circ}\text{C}$

1: Protein sedimentation rate; 2: Copper absorbance

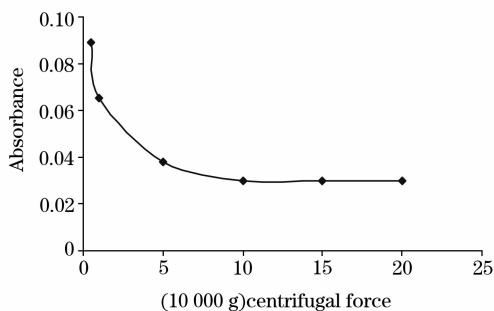


Fig. 3 The copper absorbance with different centrifugal force

2.4 干扰影响与校准曲线

按离心后的清液与不同浓度的标准溶液混合制作工作曲线, 曲线方程为: Cu, $A=0.0067-9 \times 10^{-5}$ 。相关系数为: 0.999 1, Zn, $A=0.0097+1 \times 10^{-5}$ 。相关系数为: 0.996 7。

用水溶液标准工作曲线代替上述工作曲线, 两者测定的结果非常一致, 表明大量的金属离子随着蛋白质沉降而去除, 对被测元素不会造成干扰。

2.5 检出限、精密度及回收率实验

按 3 倍空白标准偏差计算方法的检出限, Cu 的检出限为 1.2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, Zn 的检出限为 0.098 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。试验发现, 血清中蛋白质与非蛋白结合铜存在一种动态平衡, 在蛋白质变性之前加入线性范围的标准铜含量, 回收率为零。锌不存在上述现象。因此, 本文在血清加入乙醇之后充分振荡, 再加入标准铜或锌, 按 1.3.1 节方法处理, 测定游离铜和锌含量, 所得回收率和精密度见表 1。

Table 1 Recovery and RSD of determination method

样品编号	测定元素	测得值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	加入量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 / %	RSD / %
0801	Cu	6.74	20	97	4.5
	Zn	45	10	107	5.5
0802	Cu	15.4	20	91	3.7
	Zn	17	20	96	1.5
0803	Cu	25.7	10	92	5.1
	Zn	13	40	90	3.3

3 结 论^[8,9]

正常人血清 30 例测定结果, 总铜量为 $(0.911 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 游离铜含量范围为 $(18.4 \pm 5.6) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 占总铜含量百分比 1.0% 至 5.9%, 与国外固相萃取法^[4]测得的结果范围非常接近。总锌量为 $(0.956 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 游离锌含量 $(20.5 \pm 5.7) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 占总锌含量百分比 1.4%~4.9%。20 例宫颈癌病人血清测定结果表明, 总铜量 (1.42 ± 0.5)

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 游离铜含量 $(19.4 \pm 6.9.1) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 占总铜 1.6%~3.3%。测定结果与文献[3]比较, 本文测定的宫颈癌患者血清所含游离铜浓度与总铜有显著相关性(相关系数为 0.623, $P < 0.01$)。而游离铜所占百分含量与总铜含量高低却没有显著性相关性(可能与蛋白质在一定条件下和铜离子有一定的结合常数有关)。总锌量为 $(0.913 \pm 0.2) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 游离锌含量 $(23.3 \pm 7.2) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 占总锌含量百分比 0.9%~3.8%。

参 考 文 献

- [1] Haraguchi H, Fujimori E, Inagaki K. in Free Radical and Antioxidant Protocols, ed. by Armstrong D. Totwa: Humana Press, 1998. 389.
- [2] HAN Cun-zhi, ZHAO Xian-wen, JING Jie-xian(韩存芝, 赵先文, 荆洁线). Chinese Journal of Clinical Oncology(中国肿瘤临床), 1999, 8(12): 572.
- [3] Liaw K Y, Lee P H, Wel F C, et al. American Journal of Gastroenterol, 1997, 92(12): 2260.
- [4] Gow P J, Smallwood R A, Angus P W, et al. Gut, 2000, 46(3): 415.
- [5] Chan A, Wong F, Arumangyagam M. Annals Clinical Biochemistry, 1993; 30(part 6): 545.
- [6] Bohrer D, Do-Nascimento P C, Ramirez A G, et al. Clin. Chimica Acta, 2004, 345(1-2): 113.
- [7] SHI Chang-hong, GAO Shuang-bin, GONG Shu-ming(师长宏, 高双斌, 龚书明). Chinese Journal of Health Laboratory Technology(中国卫生检验杂志), 1995, 5(5): 263.
- [8] ZHANG Yuan, LUO Wen-hong, LI Hui, et al(张 源, 罗文鸿, 李 慧, 等). Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory(光谱实验室), 2001, 18(1): 53.
- [9] Bradford M. Anal. Biochem., 1976, 72: 248.

Determination of Trace Free Copper and Zinc in Serum Samples by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry after Two-Step Precipitation of Protein

ZHANG Yuan, LIN Zhe-xuan, LI Wei-qiu, ZHANG Qiao-xin, LI Hui, LUO Hong-jun, LUO Wen-hong*
Central Laboratories, Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

Abstract A method was developed for the determination of trace free copper and zinc in serum sample by GFAAS after two-step precipitation. The serum and ethanol were mixed with volume ratio of 1 : 2. The mixture was subsequently denatured at 70 °C and centrifuged to precipitate proteins. The determination limit of copper (3σ) was $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the recovery was 92.3%-104%, and the determination limit of zinc (3σ) was $0.098 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the recovery was 90%-107%. This two-step precipitation method can be used to determine non-protein-bound copper in tumor patients and healthy people.

Keywords Copper; Zinc, GFAAS; Protein precipitation

(Received May 6, 2008; accepted Aug. 8, 2008)

* Corresponding author