

原子吸收光谱法测定血清中不同化学形态的铜、铁、锌

胡 军¹, 常耀明^{1*}, 高双斌², 海春旭³, 李金声¹, 谢小萍¹

1. 第四军医大学航空航天医学系航空航天卫生与卫生勤务学教研室, 陕西 西安 710032

2. 第四军医大学预防医学系营养教研室, 陕西 西安 710032

3. 第四军医大学预防医学系毒理教研室, 陕西 西安 710032

摘 要 融合分子生物学技术与原子吸收光谱对血清中元素铜、铁和锌的化学形态进行研究。用 60%乙醇低温(4℃)沉淀血清蛋白的方法将血清中的铜、铁、锌分为结合态和非结合态, 原子吸收分光光度计分别测定血清中 Cu, Fe 和 Zn 三种元素的总量及非结合态含量, 通过减差法求出血清中结合态元素含量, 从而建立了 Cu, Fe 和 Zn 元素这两种化学形态的分离分析方法, 并讨论了有关的实验条件。该方法铜、铁和锌的检出限分别为 $9.84 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2.76 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1.06 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差为 0.30%~2.31%, 回收率为 95.0%~104.0%。该法已应用于 SD 大鼠血清中 Cu, Fe 和 Zn 三种元素不同化学形态的测量。

关键词 原子吸收光谱法(AAS); 微量元素; 化学形态

中图分类号: Q581 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2008)03-0700-04

引 言

微量元素在生命过程中发挥着极其重要的作用。例如锌构成多种酶, 参与 DNA, RNA 及蛋白质的合成, 铜是人体内 30 多种重要酶的组成和活化的必需成分, 铁是血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素酶等体系的组成部分^[1], 它们代谢紊乱与冠心病、肝硬化、糖尿病、肿瘤等疾病关系密切^[2]。因为不同元素的化学形态生物效应差别很大, 它们决定了元素在生物体内的化学行为, 表现出不同的效应^[3]。因此, 对元素作用的研究, 不但要对元素的总量进行分析, 更重要的是对元素的存在形态进行研究。目前, 医学领域除了药学对中药中的元素进行形态研究^[4], 临床和基础医学对机体元素的研究还在停留在对其总量的探讨, 对生物体微量元素化学形态的研究未见。因此, 本文研究了原子吸收光谱法测定血清中不同化学形态 Cu, Fe 和 Zn 的方法, 并对有关实验条件做了讨论。

1 实验部分

1.1 仪器及试剂

主要仪器: 日立公司 Z-2000 型偏振塞曼原子吸收分光光度仪(日本); Cu, Fe, Zn 单元素空心阴极灯; 电子分析天平(梅特勒-托利多, AL204101); 低温高速离心机(美国 Sigma)。

试剂: 硝酸(优级纯); 高氯酸(优级纯); 无水乙醇(优级纯); 实验用水均为去离子水; 实验中所用器材均为 50%硝酸(分析纯)浸泡, 去离子水冲净, 晾干, 备用; 用锌, 氧化铁, 铜高纯品(天津市化学试剂三厂), 按常规配制浓度为 $1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的铜, 铁, 锌标准储备液。

1.2 实验方法

1.2.1 人体血清中铜, 铁, 铜总量的测定

准确量取 1 mL 血清用 1%硝酸稀释至 10 mL, 用 AAS 法测定 Cu, Fe, Zn 的含量, 同时做空白实验。

1.2.2 人体血清中结合、非结合状态铜, 铁, 铜量的测定

1 mL 血清稀释 1 倍后, 在 4℃条件下, 缓慢加入无水乙醇(-20℃), 使溶液中乙醇浓度达到 60%并在冰浴上持续温和地搅拌 10 min, 低温(4℃)离心(10 000 g, 10 min)^[5]。分离上清和沉淀。用 AAS 法直接测定上清中 Cu, Fe, Zn 的含量, 及得到血清中非结合态铜, 铁和铜量的值, 同时做空白实验。血清中结合态 Cu, Fe 和 Zn 量为人体血清中 Cu, Fe 和 Zn 的总量与血清中非结合态 Cu, Fe 和 Zn 量之差。

收稿日期: 2007-05-10, 修订日期: 2007-08-20

基金项目: 全军“十一五”医药卫生课题项目(06Z041)资助

作者简介: 胡 军, 1980 年生, 第四军医大学航空航天医学系航空航天卫生与卫生勤务学教研室研究生 e-mail: hujun8031@tom.com

* 通讯联系人 e-mail: kyafwqs@fmmu.edu.cn

1.3 仪器工作条件

经仪器测定参数的实验优化, 选定最佳工作参数见表 1。

1.4 标准工作曲线及检出限

取 Cu, Fe 和 Zn 标准储备液, 分别配制 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的中间标准溶液。测定前再逐级稀释配制标准系列工作液, Cu 和 Fe 工作溶液标准系列为 0, 1, 2, 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Zn 工作溶液标准系列为 0, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。为了与样品

溶液的基体基本相同, 测定人体血清中元素总量时使用的标准系列工作溶液基体为 1% HNO_3 , 测定非结合态元素含量时使用的标准系列工作溶液基体为 60% 乙醇。在上述仪器操作条件下, 进样测定吸光度, 绘制工作曲线。做出各元素的工作曲线线性关系良好, 相关系数 r 在 0.999 5~1.000 之间。

Table 1 Operating parameters

Element	Lamp current/mA	Wavelength/nm	Slit/ μm	Fuel pressure/($\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$)	Oxidant ressure/($\text{kg} \cdot \text{cm}^{-2}$)
Zn	8.0	213.9	1.3	0.20	9.5
Fe	12.5	248.3	0.2	0.30	9.5
Cu	7.5	324.8	1.3	0.30	9.5

对空白溶液进行 11 次测定, S 为标准偏差, K 为工作曲线的斜率, 根据检出限为 $3S/K$, 求出检出限。本实验对 Cu, Fe 和 Zn 的检出限进行了测定, 其分别为 $9.84 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $2.76 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1.06 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 结果与讨论

2.1 血清蛋白沉淀剂分离元素结合态和非结合态条件的建立

血清中 Cu, Fe 和 Zn 元素的存在形式主要有: 与生物大分子结合的生物金属和自由离子^[6]。因此, 本研究中把它们分为结合态与非结合态。结合态主要指血清中与蛋白结合的微量元素, 非结合态主要指: 自由离子, 金属小分子配体, 金属多糖及部分和蛋白结合疏松的元素。使用蛋白沉淀剂把血清中的蛋白沉淀, 结合态的微量元素随蛋白进入沉淀中, 上清中剩下的元素即为非结合态元素。在结合态与非结合态的分离过程中蛋白沉淀剂的选择非常重要, 这个沉淀剂不仅要沉淀蛋白完全, 而且沉淀作用还要温和, 不能使与蛋白结合的元素分离成为游离态。我们比较了高氯酸沉淀蛋白法和乙醇低温(4°C)沉淀蛋白法(图 1 和图 2), 发现 60% 的乙醇在低温下沉淀蛋白不仅完全, 而且温和, 对结合态的元素影响小。

2.2 测定方法的准确度

为了验证测定结果的准确度, 按照试验方法, 于血清和上清中分别加入不同浓度的 Cu, Fe 和 Zn 三种元素的标准液, 进行加标回收实验, 结果见表 2 和表 3。

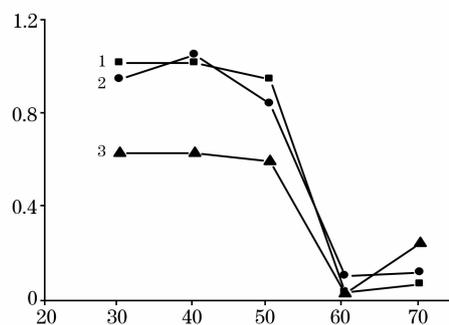


Fig. 1 Determination of trace elements Cu, Fe and Zn in supernatant after precipitate serum protein by different concentration ethanol under hypothermy

1: Cu; 2: Fe; 3: Zn

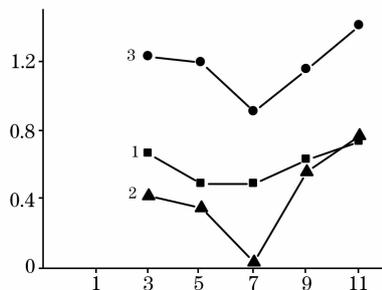


Fig. 2 Determination of trace elements Cu, Fe and Zn in supernatant after precipitate serum protein by different concentration HClO_4

1: Cu; 2: Fe; 3: Zn

Table 2 Recovery test of the method in serum($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

元素	铜	铁	锌
样品含量	0.17, 0.17, 0.17	0.33, 0.33, 0.33	0.17, 0.17, 0.17
加入量	0.20, 0.50, 1.00	0.20, 0.50, 1.00	0.20, 0.50, 1.00
加标样品	0.36, 0.66, 1.18	0.52, 0.83, 1.35	0.36, 0.67, 1.20
回收率/%	95.00, 98.00, 101.00	95.00, 100.00, 102.00	95.00, 100.00, 103.00

Table 3 Recovery test of the method in supernatant($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

元素	铜	铁	锌
样品含量	0.06, 0.06, 0.06	0.15, 0.15, 0.15	0.14, 0.14, 0.14
加入量	0.20, 0.50, 1.00	0.20, 0.50, 1.00	0.20, 0.50, 1.00
加标样品	0.25, 0.56, 1.10	0.34, 0.65, 1.17	0.33, 0.64, 1.17
回收率/%	95.00, 100.00, 104.00	95.00, 100.00, 102.00	95.00, 100.00, 103.00

2.3 测定方法的精密度

为较客观地反映测定方法的精密度,抽取 3 个不同浓度血清(A, B, C)和 3 个不同浓度的上清(D, E, F)样品,对样品中的 Cu, Fe 和 Zn 三种元素进行 7 次测定,结果见表 4 和表 5。

2.4 方法的应用

采用 10d 递增负荷的游泳运动方式建立 SD 大鼠运动疲劳模型。对疲劳 SD 大鼠血清和正常 SD 大鼠血清不同化学

形态的 Cu, Fe 和 Zn 元素进行测量(表 6)。

3 结 语

我们选择血清为分析对象,研究建立了血清中 Cu, Fe 和 Zn 三种元素化学形态的分离分析方法,结果显示该方法灵敏,准确,可靠,为探讨微量元素与机体的关系提供了比单独测量铜、铁、锌总量更多的信息。

Table 4 Precision test of the method in serum($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

元素 样品序号	铜			铁			锌		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
平均值	0.38	0.68	1.17	0.53	0.83	1.26	0.36	0.56	0.97
标准偏差	0.003 8	0.003 9	0.003 8	0.005 4	0.005 4	0.003 8	0.003 8	0.003 8	0.007 6
相对标准偏差/%	1.000 0	0.573 5	0.324 8	1.008 9	0.650 6	0.301 6	1.055 6	0.678 6	0.783 5

Table 5 Precision test of the method in supernatant($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

元素 样品序号	铜			铁			锌		
	D	E	F	D	E	F	D	E	F
平均值	0.26	0.35	0.54	0.34	0.68	1.13	0.36	0.66	1.13
标准偏差	0.004 9	0.007 9	0.012 5	0.005 4	0.003 8	0.008 2	0.004 9	0.003 8	0.003 8
相对标准偏差/%	1.884 9	2.257 1	2.314 8	1.588 2	0.558 8	0.725 7	1.361 1	0.575 8	0.335 9

Table 6 Determination of speciation of trace elements Cu, Fe and Zn in the Serum of SD rat($\bar{x} \pm s$)

元素	疲劳 SD 大鼠*			正常 SD 大鼠**		
	铜	铁	锌	铜	铁	锌
血清/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	1.57 ± 0.03	6.21 ± 0.41	1.23 ± 0.04	1.22 ± 0.06	5.84 ± 0.42	1.54 ± 0.04
结合态/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	1.42 ± 0.07	5.63 ± 0.42	1.08 ± 0.05	1.11 ± 0.05	5.08 ± 0.41	1.35 ± 0.07
非结合态/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.15 ± 0.01	0.58 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.75 ± 0.06	0.19 ± 0.03

* $n=6$; ** $n=7$

参 考 文 献

- [1] CONG Tao, ZHAO Lin(丛涛, 赵霖). Studies of Trace Elements and Health(微量元素与健康研究), 2006, 23(6): 59.
- [2] KAI Xiao-ming(开小明). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(11): 1412.
- [3] CHEN Jing-yuan(陈景元). Trace Elements and Health(微量元素与健康). Xi'an: Fourth Military Medical University Press(西安: 第四军医大学出版社), 2003. 20.
- [4] ZHANG Wei, ZHANG Zhuo-yong, SHI Yan-zhi, et al(张薇, 张卓勇, 施燕支, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(5): 963.
- [5] WANG Jia-zheng, FAN Ming(汪家政, 范明). Protein Technical Manual(蛋白质技术手册). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 2000. 68.
- [6] Szpunar J. Analyst, 2005, 130(4): 442.

Speciation Analysis of Trace Elements Cu, Fe and Zn in Serum by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry

HU Jun¹, CHANG Yao-ming^{1*}, GAO Shuang-bin², HAI Chun-xu³, LI Jin-sheng¹, XIE Xiao-ping¹

1. Department of Aerospace Hygiene, School of Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, China
2. Department of Nutriology, School of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, China
3. Department of Toxicology, School of Preclinical Medicine, Fourth Military Medical University of Chinese PLA, Xi'an 710032, China

Abstract Since biological functions of the elements are generally different, depending on their chemical forms, chemical speciation analysis is really important in metallomics research. Thus, multielement analysis and chemical speciation of the elements in serum were carried out in the present work. A hyphenated technique was developed for high-throughput speciation analysis of the copper, iron and zinc in serum by molecular biology technology and flame atomic absorption spectrophotometry (AAS). Here, Cu, Fe and Zn in serum were classified as the forms of combination and non-combination. The serum protein was precipitated by 60% concentration of ethanol under hypothermy. The forms of combination of Cu, Fe and Zn in serum which combined with proteins were in precipitations, and the forms of non-combination of Cu, Fe and Zn in serum, which were free ions, were in supernatant. The total amount of Cu, Fe and Zn in serum and the amount of the forms of non-combination of Cu, Fe and Zn were analyzed by AAS. The amount of the forms of combination of Cu, Fe and Zn was obtained by calculation. The detection limit of Cu in serum by the method is around and $9.84 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. For Fe and Zn, the detection limit is about $2.76 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.06 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The percentage recovery of trace elements Cu, Fe and Zn by the proposed procedure is in the range 95.0%-101.0%, 95.0%-102.0% and 95.0%-103.0%, respectively. The relative standard deviation (RSD) of trace elements Cu, Fe and Zn in the serum is in the range 1.88%-2.26%, 0.56%-1.59% and 0.34%-1.36%, respectively. Speciation of trace elements Cu, Fe and Zn in the serum of SD rat were analyzed by the method.

Keywords Flame atomic absorption spectrophotometry; Trace element; Speciation analysis

(Received May 10, 2007; accepted Aug. 20, 2007)

* Corresponding author