

危险因子^[10]。PRKCZ 基因在对细胞的生长、发育、蛋白质的表达具有重要的调节作用;其中在 Fas/FasL 凋亡途径中, PRKCZ 通过与死亡诱导信号复合物作用(death-inducing signaling complex, DISC),对 FasL 引起的细胞凋亡起到了逆向的调节作用^[11]。PRKCZ 在活化的细胞中定位于胞膜,能够诱导肌动蛋白的聚合、细胞结构的形成及转化和骨架的重排,参与细胞极化、细胞黏附作用、细胞分化、细胞趋化和肿瘤转移。例如在胰腺癌发生转移时 PRKCZ 能够很好的控制细胞的分化方向^[12]。尽管 IGF-1R 和 PRKCZ 基因与许多疾病的发生密切相关,但是目前关于它们的研究多局限在基因多态性上,要想彻底弄清楚这两个基因在疾病发病机制中的作用,不仅要明确经典的遗传学分子机制,也同样需要明确表观遗传致病的分子机制,甲基化是表观遗传学重要的内容之一,但这两个基因在疾病中甲基化状态的研究国内尚未报道。试验中对 IGF-1R、PRKCZ 基因启动子区甲基化的研究方法进行了一定程度的探索,明确了 IGF-1R、PRKCZ 基因的某些区域发生了甲基化现象,下一步本课题组将利用此方法,继续探讨这两个基因启动子区甲基化与某一类疾病发生的相关性奠定基础。

参考文献

[1] Dehan P, Kustermans G, Guenin S, et al. DNA methylation and Cancer diagnosis: new methods and applications[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2009, 9(7): 651-657.

[2] McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(12): 3927-3937.

[3] Levenson VV. DNA methylation as a Universal biomarker[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010, 10(4): 481-488.

• 检验技术与方法 •

[4] Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques[J]. Biogerontology, 2003, 4(4): 233-235.

[5] Lan X, Bonneville R, Apostolos J, et al. W-ChIPeaks: a comprehensive web application tool for processing ChIP-chip and ChIP-seq data[J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 428-430.

[6] Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease[J]. J Pathol, 2001, 195(1): 97-110.

[7] Lorch JH, Posner MR, Wirth LJ, et al. Seeking alternative biological therapies: the future of targeted molecular treatment[J]. Oral Oncol, 2009, 45(4/5): 447-453.

[8] Takeuchi K, Ito F. Receptor tyrosine Kinase and targeted Cancer therapeutics[J]. Bio Pharm Bull, 2011, 34(12): 1774-1780.

[9] Molinari F, Martin V, Saletti P, et al. Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal Cancer and related metastatic sites May be clinically relevant[J]. Br J Cancer, 2009, 100(7): 1087-1094.

[10] Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(7): 505-518.

[11] Leroy I, de Thonel A, Laurent G, et al. Protein kinase C zeta associates with death inducing signaling complex and regulates Fas ligand-induced apoptosis[J]. Cell Signal, 2005, 17(9): 1149-1157.

[12] Della Peruta M, Giagulli C, Laudanna C, et al. RHOA and PRKCZ control different aspects of cell motility in pancreatic cancer metastatic clones[J]. Mol Cancer, 2010, 9: 61.

(收稿日期: 2013-05-24)

水浴消解-碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法测定全血中重金属元素^{*}

刘裕婷, 张志荣, 于秋红, 赵建忠[△], 李 洁, 张 玲, 张来颖
(北京市丰台区疾病预防控制中心, 北京 100071)

摘 要:目的 建立水浴消解-八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱仪(ORS-ICP/MS)测定全血中 Cr、Ni、As、Se、Cd、Hg、TL、Pb 8 种金属元素含量的方法。方法 血液样本中加入硝酸,经水浴消解后,制备成测试液;采用八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法同时测定 8 种金属元素含量,应用标准曲线法和内标校正定量。结果 8 种金属元素在测定范围内线性良好,相关系数均大于 0.999;灵敏度高,各元素的方法检出限为 0.01~0.30 μg/L;重现性好,相对标准偏差小于 10%;准确度高,加标回收率为 90%~110%,对标准物质小牛血清成分进行分析测定,分析结果与标准值吻合。结论 水浴消解-八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱法测定全血中重金属元素简便、快速,样品用量少,为人血浆中金属元素正常值范围的确定提供了参考依据。

关键词:质谱分析法; 全血; 金属元素; 水浴消解; 八极杆碰撞反应池

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)21-2878-03

生物样品的前处理方法目前文献报道较多的有直接稀释法^[1-6]、干灰化法^[7]、湿法消解^[8]、微波消解^[9]等。直接稀释法虽然简单,但是稀释后某些元素的检出能力变差,样品与标准溶液的黏度差异可能成为影响方法准确度的因素。应该指出,由于血液和尿液中碳及 NaCl 浓度较高,由此产生⁴⁰Ar¹²C、³⁵Cl¹⁶O、³⁵Cl¹⁶O¹H、⁴⁰Ar³⁵Cl 等多原子离子干扰,直接稀释法不宜测定 V、Cr、As 等元素^[10]。干灰化法可使 Cd、Pb、Sn、Zn 等元素部分损失,As、Hg、Se 等全部损失^[10]。湿法消解操作繁

琐,需要大量的酸,对环境和人体都造成影响,且对易挥发元素的测定不适用。而微波消解所需仪器成本高,对于批量样品的测定不适用。本文采用水浴消解的前处理方法,利用八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱技术,建立测定全血中多种重金属元素的分析方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

1.1.1 主要仪器 7500 系列电感耦合等离子体质谱仪(ICP/

^{*} 基金项目:卫生部行业科研专项项目(201002001)。 [△] 通讯作者, E-mail: zhaojzh@126.com。

MS)(美国 Agilent 公司)、HH-8 数显恒温水浴锅(江苏亿通电子有限公司)、IKA VORTEX GENIUS 3 旋涡混合器(德国 IKA 公司)、ETHOS I 型微波消解仪(意大利 MILETONE 公司)、Milli-Q 纯水机(美国 MILLIPORE 公司)。

1.1.2 主要试剂 多元素混合标准溶液:10 μg/mL 的 Cr、Ni、As、Se、Cd、Tl、Pb 多元素标准溶液(美国 Accustandard 公司);汞标准溶液:1 000 μg/mL(美国 Accustandard 公司);内标混合溶液:100 μg/mL 的 Sc、Y、In、Bi(美国 Accustandard 公司);质谱调谐液:10 ng/mL 的 Li、Y、Ce、Tl、Co(美国 Agilent 公司),使用前用 1% HNO₃ 稀释为 1 ng/mL;其他试剂包括硝酸(Fisher Chem Alert)及超纯水。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 将冷冻在-70 ℃冰箱中的全血样品放置常温,测定前用旋涡混合器混匀 30 s,充分混匀后吸取 200 μL 样品置于 15 mL 离心管底部,准确称量(精确到 0.001 g);加入 400 μL 硝酸,混匀,拧紧离心管螺旋盖,于通风橱里 100 ℃水浴消解至澄清透明,显淡黄色,一般为 2~3 h,取出放至常温,用纯水定容至 5 mL,待测,同时制作样品空白。

1.2.2 标准曲线配制 多元素混合标准溶液经逐级稀释至使用液,吸取使用液,用 5%硝酸溶液配制成 Cr、Ni、As、Se、Cd、Tl、Pb 浓度为 0.00、0.05、0.10、0.30、0.50、0.70、1.00、2.00、5.00、10.00 μg/L 的标准系列;汞标准溶液经逐级稀释至使用液,用 5%硝酸溶液配制成 Hg 浓度为 0.00、0.05、0.10、0.30、0.50、0.70、1.00 μg/L 的汞标准系列;内标溶液浓度为 50.00 μg/L。

1.2.3 仪器条件 用调谐液对仪器条件进行最优化,使仪器灵敏度、氧化物、双电荷、分辨率等各项指标达到测定要求,仪器参数列于表 1。

表 1 八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱仪(ORS-ICP/MS)的仪器参数

仪器参数	参数值
RF 功率	1400 W
采样深度	8.0 mm
冷却气流速	15L/min
辅助气流速	1.0 L/min
载气流速	1.21 L/min
S/C 温度	2 ℃
雾化器	Barbington
采样锥类型和直径	镍锥,0.8 mm
截取锥类型和直径	镍锥,0.4 mm
碰撞反应池模式	He 模式
He 流量	4.0 mL/min

2 结 果

2.1 与微波消解方法的比较 分别用微波消解法及水浴消解法对标准物质小牛血清成分进行分析测定。试验结果见表 2,微波消解与水浴消解 2 种消解方式获得的测定结果均在参考值范围内,但水浴消解法所使用的仪器设备简单,成本低,易操作,更适宜大批量样品的测定。因此,选择水浴消解法处理样品。

2.2 标准曲线的线性及方法的检出限 各元素在测定范围内

具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.999。通过连续测定 7 次空白溶液,以 3 倍空白溶液的标准偏差所对应的浓度得出各元素的方法检出限,结果见表 3。各元素的方法检出限为 0.01~0.30 μg/L,可以满足分析要求。

表 2 两种消解方法的分析结果(n=6)

元素	同位素	标准参考值 (μg/L)	微波消解法 测定值(μg/L)	水浴消解法 测定值(μg/L)
Cr	52	9.8~15.0	11.1	13.9
Ni	60	15.3~21.7	18.8	17.6
As	75	13.0~18.2	17.6	17.2
Se	78	105.0~225.0	184.0	172.0
Cd	114	6.1~6.9	6.5	6.7
Hg	202	13.6~16.8	15.4	14.8
Tl	205	9.4~11.4	10.2	9.9
Pb	208	300.0~372.0	316.0	320.0

表 3 方法的检出限及相关系数

元素	同位素	检出限(μg/L)	相关系数
Cr	52	0.15	1.000 0
Ni	60	0.26	1.000 0
As	75	0.07	0.999 4
Se	78	0.30	0.999 2
Cd	114	0.01	0.999 9
Hg	202	0.13	0.999 3
Tl	205	0.02	0.999 9
Pb	208	0.04	0.999 8

2.3 准确度和精密度试验 本方法对同一血样平行测定 6 次,在样品中加入适量标准溶液并计算出各元素的 6 次加标测定的平均回收率,见表 4;并对标准物质小牛血清成分进行分析测定,见表 2,各元素(除 Se 的回收率低于 90%外)的平均回收率为 90%~110%,标准物质中各元素的测定值与标准值相符,验证了方法的准确可靠,同时考察了方法的精密度,见表 4,相对标准偏差小于 10%,方法重现性良好。

表 4 加标回收率结果(n=6)

元素	血样测定值 (μg/L)	加标值 (μg/L)	测定值 (μg/L)	相对标准偏差 (%)	回收率 (%)
Cr	0.33	0.50	0.87	3.30	108.00
Ni	0.09	0.50	0.56	4.90	94.00
As	0.15	0.50	0.68	4.60	106.00
Se	2.88	0.50	3.30	5.30	84.00
Cd	0.06	0.50	0.58	5.00	104.00
Hg	0.12	0.50	0.59	6.40	94.00
Tl	0.00	0.50	4.85	3.30	97.00
Pb	0.63	0.50	1.11	4.80	96.00

2.4 样品分析 采用本方法测定了 272 份健康人群的血液样品,测定结果见表 5。结果中 Cr、Pb 所测水平高于文献^[1]报道

的结果,其原因可能是由于样本人群存在地区差异及样本量不同所导致。

表 5 健康人群血液样品的测定结果($n=272$)

元素	均数($\mu\text{g/kg}$)	中位数($\mu\text{g/kg}$)	范围($\mu\text{g/kg}$)
Cr	5.64	3.74	0.99~66.67
Ni	3.16	0.30	0.00~14.41
As	2.36	2.23	0.00~26.78
Se	103.75	103.71	35.18~146.79
Cd	0.10	0.05	0.00~1.28
Hg	1.58	1.05	0.00~8.91
Tl	0.03	0.00	0.00~0.176
Pb	48.02	46.70	7.79~99.74

3 讨 论

由于全血样品采用水浴消解方法,消解程度没有微波消解法完全,与标准溶液在基体、电离平衡等方面存在一定差别,且存在多原子离子的干扰。而 Agilent 六极杆碰撞反应池技术能较好消除质谱型干扰。在标准模式下调谐完成后,打开 He 开关,运用自动优化程序选择 He 最佳流量,使待测元素具有较好的灵敏度和较低的背景值,最终确定 He 流量为 4 mL/min。内标校正法在一定程度上可以改善测定的精密度和补偿基体效应对测定造成的干扰。利用仪器在线加入内标功能监测信号波动情况,采用内标校正法定量,可有效地克服仪器的漂移,保证测定的准确性。本文选用 1 mg/L 钪[45]、锆[72]、钬[115]、铋[209]混合内标,覆盖低、中、高质量数的待测元素。

本方法样品前处理采样水浴消解,简化了前处理过程,具

• 检验技术与方法 •

有操作简便、仪器成本低、便于普及、适于批量样品的测定等优点,并且对于测定挥发性元素,如汞元素,水浴消解能得到较高的回收率,准确度更高,与八极杆碰撞反应池电感耦合等离子体质谱技术结合,简便、快速,灵敏度高,适用于全血中重金属元素的同时测定。

参考文献

[1] 宋娟娥,梁月琴,于水.电感耦合等离子体质谱法测定人血浆中 20 种微量元素[J].分析化学,2007,35(3):423-426.

[2] 林立,陈玉红.电感耦合等离子体质谱法直接分析全血中的铅和镉[J].中国卫生检验杂志,2008,18(5):808-809.

[3] 谢建滨,张慧敏,黎雪慧,等.直接进样碰撞池 ICP-MS 技术测定全血中二十种元素[J].中国热带医学,2009,9(8):1455-1456.

[4] 董明,张爱华,潘巧裕,等.电感耦合等离子质谱法测定全血中痕量金属元素[J].中国职业医学,2009,36(6):497-499.

[5] 王小燕,李玉锋,李柏,等.稀释法快速测定人体血液和尿液中多种重金属元素[J].分析试验室,2010,29(6):41-45.

[6] 程雅婷,杨潇明,文国学,等.电感耦合等离子体质谱技术直接测定全血中微量元素的方法及检测过程的质量控制[J].国际检验医学杂志,2010,31(12):1470-1471.

[7] 于兆水,张勤.六极杆碰撞反应池-等离子体质谱测定生物样品中痕量铬和钒[J].理化检验-化学分册,2007,43(1):11-14.

[8] 梁立娜,李中阳,陈登云,等.ICP-MS 技术测定生物样品中重金属的前处理方法研究[J].环境化学,2003,22(1):99-100.

[9] 丁亮,张森,周志荣,等.微波消解 ICP-MS 法测定全血中多种金属元素[J].卫生研究,2009,38(3):259-260.

[10] 陈抗亭,曾宪津,曹淑琴.电感耦合等离子体质谱方法在生物样品分析中的应用[J].分析化学,2001,29(5):592-600.

(收稿日期:2013-05-23)

血气分析仪测定动脉抗凝血电解质在危重患者中的应用*

史连义¹,李 津²,武彩虹¹,张 龙¹,都日娜¹

(1. 中国石油天然气集团公司中心医院,河北廊坊 065000;2. 廊坊市中医院,河北廊坊 065000)

摘 要:**目的** 探讨血气分析仪测定动脉抗凝血电解质与生化分析仪测定静脉促凝血电解质的差异,评价血气分析动脉血电解质测定用于临床的可行性。**方法** 以固体肝素锂-锌平衡动脉血气针采集动脉血用血气分析仪进行电解质测定,同时静脉采血用生化分析仪进行电解质测定。对 2 种方法结果进行方差齐性检验、配对资料的 t 检验、相关性分析及回归分析。**结果** 两种采血方法的 Na^+ 检测结果无统计学差异, K^+ 、 Cl^- 检测结果经回归方程矫正后差异也无统计学意义。**结论** 用血气分析的动脉血进行电解质测定,结果经回归方程矫正后可以用于临床。

关键词:血气分析; 电解质; 相关性分析; 失血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.042

文献标识码:A **文章编号:**1673-4130(2013)21-2880-02

重症监护病房(intensive care unit,ICU)及及新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit,NICU)重症患者由于病情复杂多变,经常要进行生命体征的监测,如进行血气分析、电解质紊乱的监测,这就要求抽取动脉血和静脉血。由此引起的检验性失血数量惊人,作者曾统计分析 25.8% ICU 患者失血量超过自体血液总量的 5.0%,61.3% 的 NICU 患儿失血量超过自体血液总量的 5.0%^[1],严重影响患者的预后。本院引进

新型血气分析仪,可用一管动脉抗凝血同时进行血气分析及电解质测定。本文对用一管动脉抗凝血同时进行血气分析及电解质测定用于临床的可行性进行探讨,为危重患者血气标本一血多用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 静脉血电解质(K^+ 、 Na^+ 、 Cl^-)测定试剂及定标液为美国强生公司产品,在 Vitros 250 干化学分析仪

* 基金项目:廊坊市科技局科技支撑项目(2011013020)。