

• 论 著 •

电感耦合等离子质谱法检测儿童末梢血多种元素

李慧源^{1,2}, 徐克前^{1△}, 汤 郡²

(1. 中南大学湘雅医学院医学检验系, 湖南长沙 410013; 2. 长沙金域医学检验所有限公司, 湖南长沙 410005)

摘要:目的 建立同时检测儿童末梢血多种元素的电感耦合等离子质谱(ICP-MS)法。方法 采用 ICP-MS 法检测湖南地区 474 例健康儿童(6 个月至 12 岁)末梢血标本钙、镁、铁、铜、锌、铅 6 种元素水平,并建立各元素的参考区间。结果 健康儿童末梢血钙、镁、铁、铜、锌、铅水平平均呈偏态分布,且男女儿童末梢血各元素水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);该地区健康儿童末梢血钙、镁、铁、铜、锌、铅参考区间分别为 57.30~81.40 mg/L、30.40~44.80 mg/L、361.20~531.40 mg/L、848.10~1469.20 μg/L、2.68~6.54 mg/L 和 0.00~100.00 μg/L。结论 成功建立了同时检测儿童末梢血钙、镁、铁、铜、锌、铅 6 种元素的 ICP-MS 法,以及各元素的参考区间。

关键词:电感耦合等离子质谱法; 微量元素; 末梢血; 参考区间
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.05.009 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)05-0600-03

Analysis of elements in peripheral blood of children by using inductively coupled plasma-mass spectrometry

Li Huiyuan^{1,2}, Xu Keqian^{1△}, Tang Jun²

(1. Department of Clinical Laboratory, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, Hu'nan 410013, China; 2. Changsha Kingmed Center For Clinical Laboratory Co., Ltd., Changsha, Hu'nan 410005, China)

Abstract:Objective To establish an inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) method for analysis of elements in peripheral blood of children. **Methods** A total of 474 healthy children in Hunan area were enrolled in this study, and six elements, including Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Pb, in peripheral blood specimens were detected by using ICP-MS method. **Results** The levels of elements, including Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Pb, in peripheral blood of healthy children showed skewed distributions, and no significant differences were found in levels of these elements between male and female children ($P>0.05$). The reference intervals of Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Pb in peripheral blood of healthy children in this area were 57.30—81.40 mg/L, 30.40—44.80 mg/L, 361.20—531.40 mg/L, 848.10—1469.20 μg/L, 2.68—6.54 mg/L and 0.00—100.00 μg/L respectively. **Conclusion** The ICP-MS method for simultaneously detecting Ca, Mg, Fe, Cu, Zn and Pb in peripheral blood of children and reference interval of each element are successfully established.

Key words: inductively coupled plasma-mass spectrometry method; trace elements; peripheral blood; reference interval

微量元素虽然在人体内浓度不高,但与生存和健康密切相关^[1-2]。儿童处于生长发育的关键期,体内微量元素水平可反映其营养状态。微量元素摄入过量、不足或缺乏都会不同程度地引起人体生理的异常或疾病的发生。微量元素铜和锌是人体新陈代谢的基本物质^[3-4],而钙、镁和铁元素则直接影响人体的生长发育^[5],因此,对处于生长发育关键期的儿童至关重要。研究显示,身材矮小的儿童体内存在不同程度的锌、铜、铁、钙缺乏^[6],微量元素的检测也可用于评价新生儿的身体状况^[7]。目前检测微量元素的方法有石墨炉原子吸收光谱法、火焰原子吸收光谱法、电极法、酶法等,这些方法简单、灵敏,但缺点是每次只能测定一种元素,不能满足临床快速检测的需求。电感耦合等离子质谱(ICP-MS)法对于大多数元素而言,具有极高的灵敏度和极低的检出限,被分析界公认为最理想的无机元素分析方法,它可同时检测多种无机元素,简便快速,目前在临床上应用越来越广泛^[8-9]。为此,本研究通过采用 ICP-MS 法就湖南地区健康儿童末梢血钙、镁、铁、铜、锌、铅等 6 种元素同时进行测定,并确定其参考取区间,以便为临床诊断及儿童微量元素的合理补充提供指导。

1 材料与方法

1.1 标本来源 所有样品均来自于湖南地区各级医院送检的

6 个月至 12 岁儿童肝素钠抗凝末梢血体检标本。共收集 474 份,其中来源于男性 230 份,女性 244 份。

1.2 仪器与试剂 肝素钠抗凝末梢血专用采血管购自广州阳普医疗科技股份有限公司;浓硝酸(UP 级)购自苏州晶瑞化学有限公司;Triton X-100 购自上海源聚生物科技有限公司;超纯水(自制),电阻率 18.2 MΩ·cm;单元素标准溶液:钙、镁、铁、铜、锌和铅浓度均为 1 000 μg/mL,购自国家标准物质研究中心;调谐液:锂(Li)、钇(Y)、铈(Ce)、铈(Ti)、钴(Co),浓度为 10 μg/L,内标液:锂(Li)、钪(Sc)、锆(Ge)、钇(Y)、铟(In)、铽(Tb)、铋(Bi),浓度为 10 mg/L,均购自美国 Agilent 公司。上机浓度:Li、Sc、Y、In、Tb、Bi 为 20 μg/L,Ge 的浓度加强至 100 μg/L;质量控制样品:Seronom Trace Elements Whole Blood L-2;稀释液:0.1% Triton X-100 和 0.1% 硝酸。Agilent 7700x 型电感耦合等离子体质谱仪购自美国安捷伦科技公司。

1.3 方法 ICP-MS 仪器工作条件:血液标本在血液混匀器上充分混匀后,用稀释液 1:19 进行稀释,在漩涡振荡器上充分振荡稀释样品后,待上机检测;质谱法采用标准曲线法进行定量,用混合内标校正基体干扰和漂移;试验固定人员操作,试验前配制标准溶液应用液,测定样品前先完成标准溶液的测量。仪器工作条件见表 1,标准溶液应用液浓度见表 2。

表 1 ICP-MS 仪器工作条件

仪器参数	参考值	仪器参数	参考值
RF 功率(W)	1 500	雾化器	Barbinton
载气流量(mL/min)	1.2	采样锥类型	Ni 质采样锥
采样深度(mm)	7.8	积分时间(s)	0.1
S/C 温度(℃)	2	重复次数	2
蠕动泵速度(r/s)	0.2	样品提升速度(r/s)	0.2

表 2 标准应用液各曲线点浓度

标准曲线点	镁 (mg/L)	铁 (mg/L)	铜 (μg/L)	锌 (mg/L)	钙 (mg/L)	铅 (μg/L)
STD0	0.0	0	0	0.000	0.0	0.00
STD1	0.5	5	4	0.008	1.0	0.08
STD2	1.0	10	20	0.040	2.0	4.00
STD3	2.0	20	100	0.200	5.0	20.00
STD4	4.0	40	500	1.000	10.0	100.00

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理与统计分析,首先检验数据是否呈正态分布。若呈正态分布,则采用 $\bar{x} \pm 1.96s$ 确定参考区间的范围;若为非正态分布,则采用第 2.5 百分位数($P_{2.5}$)和第 97.5 百分位数($P_{97.5}$)区间来确定

表 4 不同性别健康儿童末梢血微量元素水平比较($P_{2.5} \sim P_{97.5}$)

性别	<i>n</i>	镁(mg/L)	铁(mg/L)	铜(μg/L)	锌(mg/L)	铅(μg/L)	钙(mg/L)
男	230	30.50~45.00	363.50~534.20	846.10~1470.60	2.53~6.67	7.80~89.10	56.40~80.50
女	244	30.20~44.60	361.20~533.40	850.70~1450.80	2.64~6.51	6.90~92.60	55.70~83.60
<i>U</i>		−0.263	−0.806	−1.276	−1.760	−1.622	1.230
<i>P</i>		0.90	0.56	0.24	0.089	0.105	0.306

3 讨 论

本研究建立了 ICP-MS 法同时检测末梢血钙、镁、铁、铜、锌、铅等 6 种元素的方法,并确定了湖南地区 ICP-MS 法测定检测上述 6 种元素的参考区间,该方法简便、快速,为今后的临床应用奠定了基础。

本研究获得的参考区间与其他实验室统计的儿童微量元素参考区间存在差异^[10]。分析原因可能主要是检测方法的不同^[11],例如博辉 BH5100 多通道原子吸收光谱仪厂家提供的元素参考区间为:镁 26.9~49.4 mg/L、铁 400.1~672.6 mg/L、铜 591.5~2 554.5 μg/L、锌 3.8~6.6 mg/L、钙 66.7~90.3 mg/L、铅 0~100 μg/L,与本研究结果存在较大的差异。一般认为 ICP-MS 的检测数量级为百亿分率级(ppt 级),标准曲线线性范围宽,重现性好,测量速度快,在痕量(微量)分析方面优于原子吸收^[12-14]。地域差异也可能是重要原因,研究表明不同地域微量元素水平存在差异。另外,标本的差异也可能造成检测结果的差异,本研究采用的是儿童肝素钠抗凝末梢血标本,而其他实验室采用的是静脉血标本,末梢血中含组织液、微小动脉血液等成分,可对测得的参考范围造成一定程度的影响^[11]。

本研究对所有参与检测的儿童进行了性别分组,并做了统计分析。结果表明,6 种元素(镁、铁、铜、锌、铅、钙)末梢血水

95%参考区间的范围。非正态分布的计量资料组间比较采用 Mann-Whitney *U* 秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 检测结果正态性检验 采用 ICP-MS 法对湖南地区 474 例健康儿童末梢血标本中钙、镁、铁、铜、锌、铅 6 种元素水平进行检测,正态性检验显示各元素水平均呈非正态分布($P<0.05$)。见表 3。

2.2 健康儿童末梢血标本各微量元素的参考区间 健康儿童钙、镁、铁、铜、锌、铅的参考区间,见表 3。

表 3 湖南地区健康儿童末梢血微量元素分布($n=474$)

元素	<i>P</i>	分布	均值($\bar{x}$)	参考区间($P_{2.5} \sim P_{97.5}$)
镁	0.041	非正态分布	37.00 mg/L	30.40~44.80 mg/L
铁	0.022	非正态分布	436.20 mg/L	361.20~531.40 mg/L
铜	0.000	非正态分布	1 073.00 μg/L	848.10~1 469.20 μg/L
锌	0.000	非正态分布	4.20 mg/L	2.68~6.54 mg/L
钙	0.000	非正态分布	67.30 mg/L	57.30~81.40 mg/L
铅	0.000	非正态分布	41.70 μg/L	0.00~100.00 μg/L

2.3 不同性别各元素参考区间比较 不同性别健康儿童末梢血镁、铁、铜、锌、铅、钙水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

平在男、女健康儿童间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。因此,健康儿童镁、铁、铜、锌、铅、钙元素的参考区间无需按性别进行区分,可用同一个标准,这与文献[15]报道一致。

铅作为一种重金属元素,其 95%参考区间为 16.10~106.80 μg/L。按照原卫生部文件《儿童高铅血症和铅中毒预防指南》和《儿童高铅血症和铅中毒分级和处理原则》标准,儿童连续两次静脉铅水平高于 100 μg/L 即为高血铅症。因此,当儿童末梢血铅超过该值时需采集静脉血复查确诊。本研究 474 例体检儿童中末梢血铅水平在 100 μg/L 以内者占 96.8%,说明湖南地区儿童血铅处在相对安全的水平。ICP-MS 具有样品需求量少,检出限低,动态线性范围宽、精密度高、重现性好等优点,已明确被列为血铅检测可选用的分析方法^[16]。另外,与静脉血比较,儿童的末梢血更容易获得,而 ICP-MS 的样品需求量少,可以解决儿童末梢血样品少的困难。

综上所述,本研究以湖南地区健康儿童为对象,建立了 ICP-MS 法检测末梢血镁、铁、铜、锌、钙、铅元素的参考区间。而对于不同年龄阶段儿童末梢血各元素的参考区间是否存在差异等问题,则需要下一步更大样本量的研究。

参考文献

[1] Comerford KB. Recent developments in multivitamin/mineral research[J]. Adv Nutr, 2013, 4(6): 644-656. (下转第 605 页)

抑制。B 类酶又被称为金属 β -内酰胺酶(MBLs),包括 IMP、VIM、SPM、GIM、SIM、KHM 和 NDM 等^[8-9],由于其高效的碳青霉烯酶活性和对抑制剂较强的抵抗能力,它对 β -内酰胺类抗菌药物具有广泛的水解作用。C 类酶为头孢菌素酶(AmpC 酶),可由染色体和质粒介导,且插入序列 ISAbal 的存在可增强 AmpC 酶的表达^[10]。D 类酶又叫苯唑西林酶,包括 OXA-23、OXA-24、OXA-58 等^[11],是 β -内酰胺酶中最复杂多样的一种酶,几乎对所有 β -内酰胺类抗菌药物高度耐药,能降低 Ab 菌株外膜蛋白的表达^[12]。本研究对 98 株 MDR-Ab 菌进行 OXA-23、OXA-24、IMP、VIM、TEM、SHV 6 种基因检测,主要检测出 OXA-23、TEM、IMP 和 VIM 4 种基因阳性,其中 OXA-23 和 TEM 基因的检出率都达到了 71.4%(70 株),接近汤凤珍等^[13]的报道。IMP 和 VIM 基因的检出率分别为 41.8%(41 株)和 54.1%(53 株),另外同时携带 3 种以上耐药基因的 MDR-Ab 也多达 26 株以上。说明本地区耐药基因的携带以 OXA-23 和 TEM 为主,另外多种耐药基因的携带是 Ab 多重耐药的重要原因,这导致了 Ab 对多种抗菌药物的耐药及各种细菌之间耐药能力的进一步传播。

综上所述,本地区临床分离 MDR-Ab 耐药情况比较严重,耐药基因的携带以 OXA-23 和 TEM 为主,多种耐药基因是 MDR-Ab 耐药的重要原因。及时了解医院 Ab 的耐药性及耐药基因携带情况,对于预防、监测并控制医院内 Ab 感染和传播具有重要意义。临床医务人员对 Ab 感染患者应避免经验性用药,尽量根据药敏试验结果合理使用抗菌药物。

参考文献

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [2] 唐吉斌,周东升,沈志君,等. 耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌基因型检测及其耐药性[J]. 分子诊断与治疗杂志,2010,2(5):337-341.
- [3] 韩新鹏,谭湘淑,刘原. 产超广谱 β -内酰胺酶鲍曼不动杆菌耐药机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2007,27(22):1727-1730.
- [4] Smian OI,Horbas' VA,Bynda TP,et al. The role of disbalance of zinc and copper in school age children with community-aquired pneumonia[J]. Lik Sprava,2012(3/4):67-71.
- [5] Fretham SJ,Carlson ES,Georgieff MK. The role of iron in learning and memory[J]. Adv Nutr,2011,2(2):112-121.
- [6] 董国庆,汪皓,黄爱娣,等. 矮小身材儿童全血锌、铜、铁、钙、镁含量分析[J]. 中国妇幼保健,2007,22(23):3288-3289.
- [7] 肖蜜黎,黑明燕. 外周血铜锌钙镁铁与小儿疾病状态相关性的临床研究[J]. 实用预防医学,2007,14(1):171-172.
- [8] Timerbaev A,Sturup S. Analytical approaches for assaying metal-lodrugs in biological samples:recent methodological developments and future trends[J]. Curr Drug Metab,2012,13(3):272-283.
- [9] Becker JS,Matusch A,Wu B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements-recent advance and applications of LA-ICP-MS; a

- [4] 裴莉佩,潘登,徐炜烽,等. 鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型及分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志,2007,28(4):381-384.
- [5] Dinc G, Demiraslan H, Elmali F, et al. Antimicrobial efficacy of doripenem and its combinations with sulbactam, amikacin, colistin, tigecycline in experimental sepsis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. New Microbiol,2015,38(1):67-73.
- [6] 周华. 碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌耐药机制及同源性研究[D]. 浙江:浙江大学,2008.
- [7] Dhillon RH,Clark J. ESBLs; A clear and present danger[J]. Crit Care Res Prcat,2012(2012):625170.
- [8] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams[J]. Lancet Infect Dis,2011,11(5):381-393.
- [9] Khosravi Y, Tay ST, Vadivelu J. Analysis of integrons and associated gene cassettes of metallo-beta-lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia[J]. J Med Microbiol,2011,60(7):988-994.
- [10] H  ritier C, Poir  l L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in *Acinetobacter baumannii*[J]. Clin Microbiol Infect,2006,12(2):123-130.
- [11] Walther-Rasmussen J, Hiby N. OXA-type carbapenemases[J]. J Antimicrob Chemother,2006,57(3):373-383.
- [12] Bou G, Cerver   G, Dominguez M, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases[J]. J Clin Microbiol,2000,38(9):3299-3305.
- [13] 汤凤珍,张伟红,陈惠玲. 碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因型研究[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(5):354-356.

(收稿日期:2015-11-13)

(上接第 601 页)

- [2] Ward E. Addressing nutritional gaps with multivitamin and mineral supplements[J]. Nutr J,2014,13(1):72.
- [3] Hambidge KM, Miller LV, Krebs NF. Physiological requirements for zinc[J]. Int J Vitam Nutr Res,2011,81(1):72-78.
- [4] Smian OI,Horbas' VA,Bynda TP,et al. The role of disbalance of zinc and copper in school age children with community-aquired pneumonia[J]. Lik Sprava,2012(3/4):67-71.
- [5] Fretham SJ,Carlson ES,Georgieff MK. The role of iron in learning and memory[J]. Adv Nutr,2011,2(2):112-121.
- [6] 董国庆,汪皓,黄爱娣,等. 矮小身材儿童全血锌、铜、铁、钙、镁含量分析[J]. 中国妇幼保健,2007,22(23):3288-3289.
- [7] 肖蜜黎,黑明燕. 外周血铜锌钙镁铁与小儿疾病状态相关性的临床研究[J]. 实用预防医学,2007,14(1):171-172.
- [8] Timerbaev A,Sturup S. Analytical approaches for assaying metal-lodrugs in biological samples:recent methodological developments and future trends[J]. Curr Drug Metab,2012,13(3):272-283.
- [9] Becker JS,Matusch A,Wu B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements-recent advance and applications of LA-ICP-MS; a

review[J]. Anal Chim Acta,2014,835(1):1-18.

- [10] 潘在兴,李春芸,陈夏明. 海口地区成人全血微量元素的参考区间[J]. 广东医学,2015,53(1):88-90.
- [11] 杨维东,刘洁生,彭喜春. 微量元素与健康[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2007:104-110.
- [12] 宋丽华,金一. 石墨炉原子吸收法和 ICP-MS 测定地质样品中微量金的比较[J]. 分析试验室,2009,28(B12):227-229.
- [13] 卢垣宇,寻思颖,冯永渝,等. 干法消解-石墨炉原子吸收及电感耦合等离子体质谱测定肉制品和香辛料中铅含量的比较[J]. 食品科技,2013,38(12):290-293.
- [14] 毛红,刘丽萍,张妮娜,等. 应用 ICP-MS 与 AAS 测定食品中铅、镉、铜方法研究及比较[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(11):1954-1955.
- [15] 王克,陈霞,崔永凯. 李沧区健康成人血中 7 种金属元素参考值调查[J]. 微量元素与健康研究,2008,25(6):5-8.
- [16] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2015:274-278.

(收稿日期:2015-12-19)