

## 电感耦合等离子体质谱法测定尿中钙元素含量

郑华宁<sup>1,2</sup>, 刘书君<sup>2,3</sup>, 顾若兰<sup>2</sup>, 孟志云<sup>2</sup>, 朱晓霞<sup>2</sup>, 周大兴<sup>1</sup>, 梁月琴<sup>4</sup>, 窦桂芳<sup>2\*</sup>

(1. 浙江中医药大学药学院药理学系, 杭州 310053; 2. 军事医学科学院输血研究所药代动力学重点实验室, 北京 100850

3. 华北煤炭医学院, 唐山 063000; 4. 国家生物医学分析中心, 北京 100850)

**摘要** 目的: 建立电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)测定大鼠尿中钙元素含量的方法。方法: 将大鼠尿样用2%硝酸稀释后, 选用合适的内标元素对钙基质干扰进行校正, 采用电感耦合等离子体质谱法直接测定尿中钙元素的含量。结果: 钙的含量测定方法在0.2~8.0 μg·mL<sup>-1</sup>范围内呈良好的线性关系( $r=0.9995$ ,  $n=6$ ), 日内和日间精密度的RSD均小于2.6%, 相对误差小于2.3%, 回收率为99.1%~101.1%。结论: 此方法简单、准确, 灵敏度高, 精密度及准确度均符合要求, 结果令人满意。

**关键词:** 电感耦合等离子质谱; 钙剂; 尿

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1525-03

## Direct determination of calcium in rat urine by inductively coupled plasma mass spectrometry

ZHENG Hua-ning<sup>1,2</sup>, LIU Shu-jun<sup>2,3</sup>, GU Ruo-lan<sup>2</sup>, MENG Zhi-yun<sup>2</sup>,  
ZHU Xiao-xia<sup>2</sup>, ZHOU Da-xing<sup>1</sup>, LIANG Yue-qin<sup>4</sup>, DOU Gui-fang<sup>2\*</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University Hangzhou 310053, China; 2. Key Laboratory of Pharmacokinetics Institute of Transfusion Medicine

Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China

3. North China Coal Medical College Tangshan 063000, China; 4. National Center of Biomedical Analysis, Beijing 100850, China)

**Abstract Objective** To develop an inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS) method to determine calcium in rat urine. **Methods** Urine samples were diluted with 2% HNO<sub>3</sub>. The interference of calcium matrix was corrected by selecting appropriate internal standardization element. Urine samples were directly determined by ICP-MS. **Results** A good linear relationship was obtained between the range of 0.2-8.0 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=0.9995$ ,  $n=6$ ); The inter-day and intra-day accuracy were both lower than 2.6%, and the relative error was lower than 2.3%; The recovery rate was 99.0% - 101.1%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable and can be applied to the sample with satisfactory results.

**Key words** inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS); calcium; urine

钙制剂是药、食同源的制剂。作为药物, 可以治疗因钙缺乏引起的百余种疾病, 疗效显著; 作为保健品, 在预防各种钙缺乏疾病发生, 保证人体健康方面, 也有良好的效果。体内测定钙元素的方法有偶氮砷II测定法、电极电位法、原子吸收光谱法、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)<sup>[1]</sup>、快原子轰击质谱法(FAB-MS)<sup>[2]</sup>、放射性核素示踪法<sup>[3]</sup>等。电感耦合等离子质谱方法具有检测限低、动态线性范围宽、干扰少且易消除等优点<sup>[4]</sup>, 已经在环境分析、卫生防疫方面有广泛的应用<sup>[5]</sup>。本研究建立了尿中钙元素的分析方法, 并测定了18只大鼠的尿钙累积排泄

量, 为钙制剂的吸收利用程度的评价奠定了基础。

### 1 仪器和材料

**1.1 仪器与动物** 电感耦合等离子体质谱仪(美国Agilent 7500Ce ICP-MS), Babington雾化器, 镍采样锥和截取锥(Agilent Technologies Co. Ltd., USA)。超纯水处理系统 Milli-Q Element A10痕量元素分析型超纯水系统(美国Millipore S.A.S.)。3K15低温高速离心机, 德国SIGMA公司。万分之一精密电子天平, 北京医用天平厂。健康SD大鼠18只, 体重200~250 g, 军事医学科学院实验动物中心提供, 实验动物合格证SCXK(军)2007-004。大鼠饲养遵照军

\* 通讯作者, Tel: (010) 66932951; E-mail: douguifang@vip.163.com

事医学科学院药物代谢重点实验室标准操作规程。实验温度维持在 20~25℃,相对湿度为 30%~50%。

**1.2 药品与试剂** 氨基酸螯合钙(钙含量 11.5%~13.5%,批号 20080618 许昌元化生物科技有限公司);钙尔奇 D 片(每片相当于钙 600 mg 批号 0812312 惠氏制药有限公司生产);混合内标液(par# 5184-3566 Agilent公司):包含 Sc, In, Ge, Y, Th, Bi 元素,浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;调谐液(Par# 5184-3566 Agilent公司):包含 Li, Y, Ce, Tl, Co 元素,浓度为  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;标准储备液为美国安捷伦公司提供的混合标准液(Par# 5183-4688),浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;硝酸(65%,优级纯,Merck公司);水为 Milli-Q 超纯去离子水( $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )。

## 2 实验方法

**2.1 ICP-MS 工作条件** 高频发生器(RF)功率:1.5 kW;采样深度:7 mm;雾化器温度:2℃;载气流量:1.22  $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ;采样锥:0.4 mm;截取锥:0.2 mm;蠕动泵:0.12 rps;样品提升速度:0.5 rps;离子径:软提取模式;碰撞池模式:He 模式;He 流量:5  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

**2.2 同位素及内标元素的选择** 在质谱测定中,许多元素具有多个同位素,按照丰度大、干扰小、灵敏度高的原则选择同位素。在质谱分析过程中,分析信号会随时间而发生漂移,而且分析样品时基体效应明显,被测物信号会出现抑制或增强效应。内标元素的选择,不仅能改善精密度,而且还能补偿随浓度倍增的干扰,较有效地解决了信号被抑制或增强的问题。本实验选择  $^{45}\text{Sc}$  作为内标,符合下列内标选择的原则:内标在样品中不存在;与  $^{44}\text{Ca}$  的质量数相近;电离电位相近;沸点相近。

**2.3 干扰及消除** 方法的干扰有质谱干扰和非质谱干扰。质谱干扰主要有同量异位素、多原子、双电荷离子、氧化物等,采用优化仪器条件、干扰校正方程等方法消除。非质谱干扰主要为基体效应,采用稀释样品、内标校正、标准加入、基体消除等方法克服。由于通过在线加入内标溶液以及用内标法定量,可避免仪器漂移影响测量的准确性。

**2.4 系列标准溶液的制备** 取标准储备溶液,加入 2% (w/v) 硝酸溶液稀释成 0.0, 0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  系列标准溶液。

**2.5 样品处理** 未给药大鼠尿样处理方法:取出尿样放置使达到室温,充分摇匀,8000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取出上清液,将 0.4 mL 置于样品管里,加入 2% (w/v) 硝酸溶液 3.6 mL,混匀供测定;给药后大

鼠尿样处理方法:取出尿样放置使达到室温,充分摇匀,8000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取出上清液,将 0.1 mL 置于样品管里,加入 2% (w/v) 硝酸溶液 3.9 mL,混匀供测定。

**2.6 内标溶液的配制以及引入** 精密称取混合内标液 5 mL,加入 2% (w/v) 硝酸溶液稀释至 50 mL,得到  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的内标溶液。内标溶液的引入采用双蠕动泵进样系统,将内标溶液与空白溶液、标准溶液、样品溶液分别采用 2 支不同内径的泵管,以同样泵速导入仪器,在进入雾化器前混合。这样可减少大量的溶液配制工作,同时可有效节省内标溶液,内标溶液在整个分析过程中保持恒定。

## 3 方法学确证

**3.1 线性关系考察** 分别取“2.4”项下系列标准溶液,按选定测定工作条件进行测定。以 Ca 浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标,以 Ca 与内标 Sc 的计数比为纵坐标,得到标准曲线方程为:

$$Y = 1.998 \times 10^{-5} X + 0.01504 \quad r = 0.9995 (n = 6)$$

Ca 元素浓度在 0.2~8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内线性关系良好,定量下限为 0.2  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**3.2 精密度和准确度** 分别制备低、中、高 3 个浓度 (1.0, 2.0, 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的质量控制 (QC) 样品,每个浓度点 6 份,依法与标准曲线同批测定,重复测定 3 d 随行标准曲线,以当日的标准曲线计算 QC 样品的浓度。据此求算方法的准确度和精密度。分析方法的准确度用相对误差 (relative error, RE) 表示,即测得值的均值与理论值之间的百分误差值。采用单因素方差分析法计算分析方法的日内和日间精密度。3 个浓度点的准确度、日内精密度与日间精密度分别列于表 1,结果均符合目前生物分析方法指导原则的要求。

表 1 准确度与精密度 ( $n = 6$ )

Tab 1 The accuracy and precision of the assay

浓度 (concentration) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$\pm \text{RE} \%$	精密度 (precision), RSD %	
		日内 (intra-day)	日间 (inter-day)
1.0	0.9	1.9	2.3
2.0	1.1	2.6	1.5
8.0	0.4	1.9	2.0

**3.3 回收率** 分别制备标准溶液,浓度分别为 1.0, 2.0, 8.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,测定钙元素的加样回收率和 RSD。结果见表 2。

## 4 方法应用

SD 大鼠 18 只,随机分为 3 组,空白组灌胃纯净水,给药组和对照组按照体重剂量  $600 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  分

表 2 回收率及 RSD 试验结果 (n = 6)

Tab 2 Results of recovery and RSD

加入量 (concentration) μg · mL <sup>-1</sup>	回收率 (average recovery) %	RSD %
1.0	99.1	2.3
2.0	101.1	1.7
8.0	99.6	2.0

别灌胃给予氨基酸螯合钙与钙尔奇, 给药前 12 h 禁食, 给药后禁食 6 h 期间自由引用纯净水。给药后在 0~6 h 6~12 h 12~24 h 24~48 h 48~72 h 时间区间收集尿液, 记录尿体积, 并保存于 -20 °C。用经可靠性确证的分析方法测定尿钙的浓度, 根据不同时间段尿钙排泄量, 可得尿钙排泄总量, 将所求得的尿钙排泄总量扣除空白组的尿钙排泄总量与灌胃的钙量相比, 可得尿钙累积排泄率。绘制尿钙累积排泄率见图 1。

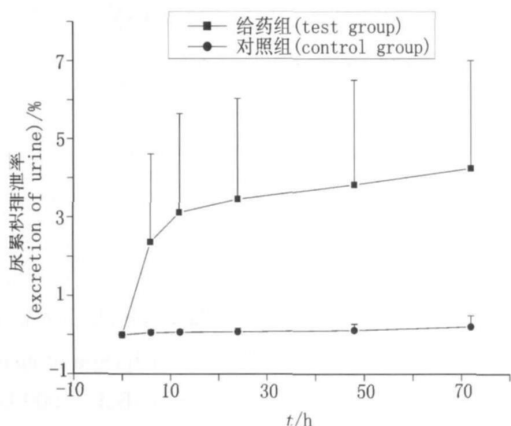


图 1 大鼠口服 600 mg · kg<sup>-1</sup> 后平均尿钙累积排泄率 - 时间曲线  
Fig 1 Mean excretion ratio of calcium in urine after a single oral 600 mg · kg<sup>-1</sup> dose of calcium in rats

## 5 讨论

测定体内钙离子浓度通常采用原子吸收分光光度法, 但该方法共存离子干扰大, 线性范围窄, 需加入电离剂方可测定。放射性核素示踪法由于稳定同位素价格昂贵, 对仪器的检测要求高, 受实验条件的限制, 该技术在国内应用较少。FAB-MS 设备简易, 样品处理简单 (只需将尿钙用草酸铵沉淀离心后, 再以盐酸溶解即可进样), 但该方法的精密度和灵敏度相对较低。电感耦合等离子光谱法具有抗干扰强、线性范围广的特点, 因而本实验采用该方法测定体内钙离子浓度, 简化测定程序, 提高了检测精确度。采用该方法测定体内内源性钙离子尚未见报道。

现行国家标准方法对尿样等生物材料中元素测

定前处理多采用酸消解方法, 操作烦琐费时, 引入污染多。本方法采用 2% 硝酸稀释后直接进样, 利用 ICP-MS 高灵敏度的特点, 简化了分析步骤<sup>[6]</sup>。

为降低空白大鼠尿钙的本底干扰, 各组大鼠自由饮用纯净水, 并且喂食含钙较低的食物。在样品处理过程中, 空白大鼠尿样稀释 10 倍, 而给药大鼠尿样稀释 40 倍, 可使样品中钙的含量不超出线性范围, 保证测定的准确性<sup>[7]</sup>。

在 ICP-MS 分析过程中, 分析信号会随进样时间而发生漂移, 因此选用内标法进行测定。选用内标法可以改善测定的精密度和补偿基体浓度变化的干扰, 选择内标的原则是: 质量接近 (差别小于 50 amu), 电离能尽量接近, 沸点相近, 本实验选择 Sc 作为内标, 符合选择的原则。

## 参考文献

- ZHAO Li-mei (肇丽梅), CHEN Ming (陈明), GUO Shan-bin (郭善斌), *et al.* Relative bioavailability of compound calcium carbonate granules in healthy volunteers (复方碳酸钙颗粒剂人体相对生物利用度). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2003, 23(7): 402
- Jiang X, Smith DL. Quantitation of stable isotopic tracer of calcium by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem*, 1987, 59: 2570
- WANG Hong-yun (王宏允), JIANG Ji (江骥), HU Bei (胡蓓), *et al.* Determination of bioavailability of calcium supplement with double label stable isotope technique (双稳定核素示踪技术评价钙剂生物利用度). *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2004, 20(4): 305
- HUANG Jian-quan (黄建权), HU Xin (胡欣), ZHANG Jun-ren (张君仁), *et al.* Application of inductively coupled plasma mass spectrometry in pharmaceutical analysis (ICP-MS 技术在药物分析中的应用). *J China Pharm* (中国药房), 2006, 17(8): 624
- LIAN Xiao-wen (连晓文), LIANG Xu-xia (梁旭霞), CAI Wen-hua (蔡文华), *et al.* Study of testing Pb Cd As Cu in high calcium food by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS 法测定高钙食品中铅、镉、砷、铜的研究). *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2007, 17(5): 775
- XIE Jian-bin (谢建滨), ZHANG Hui-min (张慧敏), LI Xue-hui (黎雪慧), *et al.* Direct determination of multi-element in urine by octopole reaction system inductively coupled plasma mass spectrometry (尿中 10 种元素碰撞池 ICP-MS 方法快速测定). *Chin J Public Health* (中国公共卫生), 2008, 24(8): 975
- Heller H, Stewart A, Havnes S, *et al.* Pharmacokinetics of calcium absorption from two commercial calcium supplements. *J Clin Pharmacol* 1999, 39(11): 1151

(本文于 2009 年 4 月 28 日收到)