

固体进样石墨炉原子吸收光谱技术在测定大鼠脑铁含量中的应用

张楠¹, 生庆海², 石振华¹, 张志国², 段相林¹, 常彦忠^{1*}

1 河北师范大学生命科学院铁代谢分子生物学研究室, 河北 石家庄 050016

2 石家庄三鹿集团股份有限公司, 河北 石家庄 050071

摘要 石墨炉原子吸收光谱法是测定动物脑组织 Fe 含量的常用方法, 然而由于传统的液体进样方法中, 样品前处理阶段用硝酸消解周期长, 成本高耗时长, 限制了原子吸收光谱技术在测定动物组织中 Fe 含量的应用。文章以 SD 大鼠脑部海马、纹状体、皮层为实验材料, 采用固体进样器进样, 利用石墨炉原子吸收光谱技术对各组织中的 Fe 含量进行了测定, 并与传统方法——硝酸消解样品后, 液体进样的石墨炉原子吸收光谱测定结果做了比较, 结果表明这两种方法所测结果无显著性差异, 但应用固体进样法, 样品前处理阶段明显简单, 显著节省了样品准备时间, 降低了工作量, 使测定时间明显缩短, 成本明显降低, 并且能够有效避免外界因素对测定结果的影响, 为固体进样法的进一步应用奠定了基础。

关键词 石墨炉原子吸收光谱; 固体进样; 脑区; Fe 含量

中图分类号: O657.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)04-1127-04

引言

Fe 是人体的必需微量元素。作为血红蛋白、细胞色素、各种氧化还原酶的必要组成成分, 体内众多的生化反应都需要 Fe 参与。Fe 代谢紊乱可引起多种常见疾病, 例如, Fe 缺乏可造成贫血、智障等; 而 Fe 过量则可促发大量自由基, 引起神经退行性病变及许多与老年相关的疾病^[1]。因此, 研究脑 Fe 代谢调控的分子机制具有十分重要的理论和现实意义。准确、快速检测脑 Fe 含量是这一研究过程中的重要环节。常用的实验动物一般是小鼠或大鼠, 脑部各个区域都很小, 而且组织内的含 Fe 量很低, 常用的组织测 Fe 方法不能满足对不同脑区 Fe 含量的测定。石墨炉原子吸收光谱法(graphite furnace atomic absorption spectrometry, GFAAS)便成为了测定不同脑区 Fe 含量的手段^[2-4]。

原子吸收光谱法是基于气态的基态原子外层电子对紫外光和可见光的吸收为基础的分析方法。其基本原理为: 从空心阴极灯或光源中发射出一束特定波长的入射光, 在原子化器中待测元素的基态原子蒸汽对其产生吸收, 未被吸收的部分透射过去。通过测定吸收特定波长的光量大小, 来求出待测元素的含量^[5]。石墨炉原子吸收光谱法是将处理好的待测样品注入可被加热的石墨管中, 经过预先设定的干燥、灰

化、原子化等升温程序使共存机体成分蒸发出去, 同时在原子化阶段的高温下 Fe 化合物解离为基态原子蒸气, 并对空心阴极灯发射的特征谱线产生选择性吸收。在选择的最佳条件下, 通过背景扣除, 测定样品中 Fe 的吸光度, 从而得出样品中 Fe 含量^[6]。

一直以来, 对不同脑区 Fe 含量的测定首先要对样品进行长时间的硝酸消解, 然后再多次稀释, 不仅浪费了大量时间还有可能造成很大误差, 对研究脑 Fe 水平变化带来了很大不便^[2-3]。

采用固体进样的石墨炉原子吸收光谱是新近发展起来的技术, 由于其样品处理简单易行, 所需样品量很少, 为测定动物微量组织中 Fe 的含量提供了很大方便, 目前为止, 尚未发现应用该方法测定脑 Fe 含量的报道。

本研究运用固体进样石墨炉原子吸收光谱技术测定了年龄对大鼠大脑皮层、海马、纹状体等脑区 Fe 水平的影响, 并与传统的测定方法进行了比较。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

主要仪器: NovaA-400 型原子吸收分光光度计, 固体进样器 (Solid sampling system SSA61Z, 德国耶拿公司), 石墨

收稿日期: 2007-11-28, 修订日期: 2008-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570957)和河北省自然科学基金项目(C2006000152, C2007000251)资助

作者简介: 张楠, 女, 1983年生, 河北师范大学生命科学院博士研究生 e-mail: zhangnanhnbnu@163.com

* 通讯联系人 e-mail: chang7676@163.com

炉原子吸收分光光度计(GFAAS, Perkin Elmer, Analyst 100, Wellesly, MA), 超声破碎机(MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator Scientific Instruments, Sussex, United Kingdom)。

主要试剂: 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Fe 标准溶液 GSB G 62020-90(2601)(国家钢铁材料测试中心, 钢铁研究总院), 标准物质小麦粉 GBW08503b(国家粮食局科学研究院, 国家标准物质研究中心) Fe 含量(37.7 ± 9.4) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 超纯度硝酸, HEPES, 硝酸镁等购自 Sigma 公司。

1.2 样品制备

1.2.1 固体进样石墨炉原子吸收光谱法测定的样品制备

取不同年龄组 SD 大鼠不同脑区: 大脑皮层、海马、纹状体组织适量, 110 $^{\circ}\text{C}$, 烘箱干燥 4 h 备用。

1.2.2 普通液体样品的制备

取不同区域脑组织适量放入 HEPES 缓冲液中(1:20 的重量体积比)进行超声破碎处理, 取 50 μL 匀浆液加入到等体积的超纯度硝酸中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 消化 48 h, 按照 1:40 的稀释度将消解液与 3.12 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸溶液混合后进行 Fe 含量的测定^[2, 3]。

1.3 测定条件

用固体进样石墨炉原子吸收法测 Fe, 测定波长 248.8, 狭缝宽度为 0.2 nm, 灯电流为 2.0 mA, 石墨炉升温程序见表 1。

Table 1 Temperature rising process of graphite furnace

步骤	温度/ $^{\circ}\text{C}$	升温速率/ $^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$	保持时间/s	氦气流量
Drying	90	5	20	m ax
Drying	105	3	20	m ax
Drying	110	2	10	m ax
Pyrolysis	1 100	250	10	m ax
AZ*	1 100	0	6	m ax
Automiza	2 000	1 500	4	m ax
Cleanout	2 300	500	4	m ax

液体进样石墨炉原子吸收法测定 Fe 含量, 测定波长 248.3 nm, 狭缝宽度 0.2 nm, 预处理温度 1 400 $^{\circ}\text{C}$, 原子化温度 2 400 $^{\circ}\text{C}$ 。每次上样体积为 50 μL , 内含 0.05 mg 的硝酸镁进行校正。

1.4 标准曲线的绘制

1.4.1 固体进样法标准曲线的绘制

稀释 1 000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准 Fe 溶液至 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分别移取 1.25, 2.5, 3.75, 5, 6.25 mL 用 2% HCl 定容至 25 mL, 配制成分别含 Fe 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液, 每次进样 8 μL , 使其中含 Fe 量分别为 3.2, 6.4, 9.6, 12.8, 16 ng, 在上述仪器工作条件下测各浓度溶液的吸光度, 扣除背景后绘制标准曲线(见图 1)。

1.4.2 液体进样法标准曲线的绘制

将标准 Fe 溶液稀释至 0, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 空白对照采用含 0.2% 硝酸的匀浆液, 每次进样 50 μL , 内含 0.05 mg 的硝酸镁进行测定。

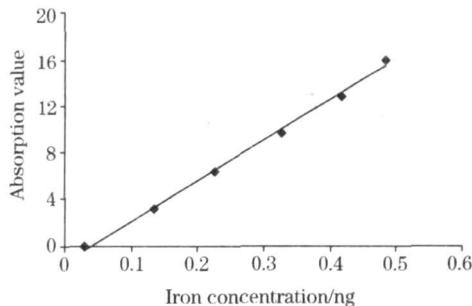


Fig 1 Iron standard curve

2 结果与讨论

2.1 标准曲线正确性的检验

用于固体进样法测定绘制的标准曲线经过反复验证, 并且用已知 Fe 含量的国家标准物质小麦粉检验, 验证结果证明曲线准确。

2.2 年龄对大鼠不同脑区 Fe 含量的影响

采用固体进样法, 利用石墨炉原子吸收分光光度计测定不同年龄大鼠大脑皮层、海马和纹状体组织中的 Fe 含量, 结果发现: 随着年龄增加, 不同脑区的 Fe 含量也随之增加, 但不同脑区增加的特征不同。出生后 7 和 21 d 的大鼠大脑皮层、海马和纹状体 Fe 含量变化不明显, 均略有降低, 可能是该时期脑的快速发育, 对 Fe 的需求增加, 但脑 Fe 吸收的速度不能与之相适应造成的。3 个月成年大鼠大脑皮层、纹状体 Fe 含量与刚断乳(出生后 21 d)相比, 大脑皮层和纹状体区域 Fe 含量显著增加, 海马 Fe 含量也增加但没有统计学意义。当大鼠长到中老年(11 月龄), 皮层、海马和纹状体 Fe 含量均比 3 月龄大鼠显著增高, 老年大鼠(21 月龄)脑内, 3 个脑区 Fe 含量的增加与 3 月龄相比均有极显著性差异, 海马脑区 Fe 含量最高, 达到(71.27 ± 7.57) $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干重组织, 与 11 月龄相比也有显著性变化。但与 11 月龄相比其他脑区的 Fe 没有显著性变化(如表 2)。新的研究发现, 脑 Fe 的过度积累与多种神经退行性疾病的发病有关, 阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)患者脑内海马神经元有大量变性坏死, 氧化应激水平的增高与其关系密切^[7-9]。Fe 通过 Fenton 反应, 可以产生毒性较强的羟自由基, 对神经细胞能够造成严重伤害^[10, 12], 我们的研究结果显示: 老年大鼠脑内海马区域 Fe 水平显著增高, 由此引发的毒性损伤可能会增强, 从而为 Fe 过度积累引起神经细胞变性损伤和老年性痴呆的发生提供了实验依据。

2.3 液体进样法测定大鼠脑 Fe 含量

通过组织悬液制备, 硝酸消解, 液体稀释等过程的样品制备, 利用石墨炉原子吸收分光光度计测定微量组织 Fe 含量的方法, 是目前国内外常用的方法^[2, 3, 13, 14], 为了检验固体进样法的可靠性, 我们还选用了出生后 11 个月的大鼠脑组织, 用传统液体样品制备的方法测定了大脑皮层、海马和纹状体 Fe 含量, 如表 3 所示: Fe 含量在 12.27~14.15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 湿重组织。三种组织的 Fe 含量没有显著性变化。

Table 2 Regional brain iron concentrations ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ dry tissue weight) in developing rats

	7天($n=6$)	21天($n=6$)	3月龄($n=6$)	11月龄($n=6$)	21月龄($n=6$)
皮层	35.98±8.16	34.68±3.30*	45.56±4.12	55.8±11.17*	57.34±6.45**
海马	43.99±13.86	36.69±3.88	42.03±11.46	60.86±13.64*	71.27±7.57**#
纹状体	37.29±9.56	34.43±5.55*	43.68±8.83	59.9±18.98*	60.25±7.44**

* $P < 0.05$, versus to postnatal day 3 months; ** $P < 0.01$, versus to postnatal day 3 months; # $P < 0.05$ versus to postnatal day 11 months

Table 3 Regional brain iron concentrations in rats at postnatal 21th day

组织种类	皮层	海马	纹状体
Fe 含量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 湿重组织)	13.69±0.67	12.27±0.75	14.15±0.94
Fe 含量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干重组织)	60.37±2.95	54.11±3.31	62.40±4.15

2.4 固体进样与液体进样法 Fe 含量测定结果的比较

为了验证固体进样法测定结果的准确性,我们又选用出生 21 d 的大鼠,测定了其脑部皮层、海马和纹状体的 Fe 含量,如果将测定的结果换算成干重组织中的 Fe 含量^[7],其数值大约应该在 54.11~62.40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干重组织范围内(见表 3),与固体样品测定法所测定的结果相近。

固体进样和液体进样石墨炉原子吸收光谱法其检测原理是一样的,工作过程也基本一致,都是经过预先设定的干燥、灰化、原子化等升温程序,在原子化阶段高温下,使 Fe 化合物解离为基态原子蒸气,对空心阴极灯发射的特征谱线产生选择性吸收,在选择的最佳条件下,通过背景扣除,测定样品中 Fe 的吸光度,从而得出样品中 Fe 含量。其关键区别在于样品的制备和测定条件的选择。

固体样品的制备过程简单,只需将一定量的新鲜组织放入烤箱直接烘烤 4 h 以上即可用于测定。在这一过程中,组织一直处于隔离状态,避免外界环境中微量 Fe 对测定结果

的影响,能够提高测定结果的稳定性。其次,固体样品的制备所用器皿、试剂少,避免了传统样品制备过程中繁杂的准备、处理过程,显著节省样品准备时间,降低了工作量。第三,液体样品制备过程需要超纯度硝酸,消化时间为 48 h,之后还要根据溶液中 Fe 含量的高低对液体进行一定倍数的稀释,然后才能用于测量^[2,3]。而固体样品的制备不需这一复杂的过程,因此使样品测定的成本更低。

总之,固体进样石墨炉原子吸收光谱技术适合测定微量组织中 Fe 含量,该方法不仅能够有效避免外界因素对测定结果的影响,还能够节省测定时间、减少工作强度,还能够有效减低测定成本,必将广泛应用于微量动物组织 Fe 含量测定。

致谢:本研究得到石家庄三鹿集团股份有限公司马健,贾云虹,杜彦山和河北师范大学王浩,赵宁等的大力帮助,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Ke Y, Qian Z M. Progress in Neurobiology, 2007, 83(3): 149.
- [2] Ke Y, Chang Y Z, Duan X L, et al. Neurobiology of Aging, 2005, 26(5): 739.
- [3] Chang Y Z, Qian Z M, Wang K, et al. Journal of Cellular Physiology, 2005, 204(2): 623.
- [4] SUN Rui-xia, SU Yong-xiang, SUN Jian-hui(孙瑞霞, 苏永祥, 孙剑辉). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(4): 720.
- [5] HAN Ping, LIU L-e, LIU Jie, et al(韩萍, 刘利娥, 刘洁, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2005, 25(9): 1507.
- [6] YUAN Xia, SHEN Shi-gang, SUN Han-wen(原霞, 申士刚, 孙汉文). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2007, 27(1): 186.
- [7] Ke Y, Qian Z M. Lancet Neurol., 2003, 2(4): 246.
- [8] Qian Z M, Shen X. Trends Mol. Med., 2001, 7(3): 103.
- [9] YU Peng, DU AN Xiang-lin, QIAN Zhong-ming, et al(于鹏, 段相林, 钱忠明, 等). Chinese Journal of Clinical Rehabilitation(中国临床康复), 2005, 9(9): 254.
- [10] CHANG Yan-zhong, DU AN Xiang-lin, QIAN Zhong-ming(常彦忠, 段相林, 钱忠明). Progress in Physiology Science(生理科学进展), 2002, 33(2): 101.
- [11] Blomgren K, Hagberg H. Free Radical Biology & Medicine, 2006, 40: 388.
- [12] Leonard S S, Harris G K, Shi X. Free Radical Biology & Medicine, 2004, 37(12): 1921.
- [13] Erikson K M, Pinero D J, Connor J R, et al. Nutrient Metabolism, 1997, 127: 2030.
- [14] Pinero D J, Li N Q, Conner J R, et al. Nutritional Neuroscience, 2000, 130: 254.
- [15] Xiao F, Arnold T C, Zhang S, et al. Academic Emergency Medicine, 2004, 11(10): 1001.

Application of Solid Sampling Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry to Mensuration of Brain Iron Content in Rats

ZHANG Nan¹, SHENG Qing-hai², SHI Zhen-hua¹, ZHANG Zhiguo², DUAN Xiang-lin¹, CHANG Yan-zhong^{1*}

1. Laboratory of Molecular Iron Metabolism, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

2. Shijiazhuang Sanlu Group Co., Ltd, Shijiazhuang 050071, China

Abstract In the present study, the authors performed the solid sampling and detected the iron levels in cortex, hippocampus and striatum of rat brain by GFAAS. The authors' results showed that there are no remarkable difference between the data obtained by solid sampling graphite furnace atomic absorption and liquid sampling graphite furnace atomic absorption. Compared to liquid sampling graphite furnace atomic absorption, the sample pre-treatment stage was obviously simplified, the cost was reduced significantly, and the time was shortened significantly in the solid sampling GFAAS. This study will be beneficial to the mensuration of iron content in micro-tissue of animal by solid sampling GFAAS.

Keywords GFAAS; Solid sampling; Brain regions; Iron content

* Corresponding author

(Received Nov. 28, 2007; accepted Mar. 6, 2008)

(上接 1126 页)

26-30 Fourier Transform Spectroscopy Meeting,
Vancouver, British Columbia, Canada;

Contact: OSA Customer Services, Tel. (202) 416-1907, Fax: (202) 416-1096;

E-mail: custserv@osa.org

Web site: <http://www.osa.org/meetings/topicalmeetings/FTS/>

May 2009

31-June 4 ASMS 2009- 57th ASMS Conference on Mass Spectrometry,
Philadelphia, PA;

Contact: American Society for Mass Spectrometry, 2019 Galisteo St., Building I-1, Santa Fe, NM, 87505; Tel. (505) 989-4517, Fax: (505) 989-1073;

E-mail: office@asms.org

Web site: <http://www.asms.org/>

July 2009

19-23 51st Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry,
Snowmass, CO;

Contact: E-mail: info@rockychem.com

Web site: <http://www.rockychem.com/>

August 2009

30-September 4 18th International Mass Spectrometry Conference (IMSC),
Bremen, Germany;

Contact: 18IMSC Secretariat, Institute of Chemistry, Brook-Taylor-Str. 2, 12489 Berlin, Germany; Fax: 49 30 2093 6985;

E-mail: office@imsc-bremen-2009.de

Web site: <http://www.imsc-bremen-2009.de/>

Short Courses

April 20-23, 2009 CETAC Technologies ICP-AES/ICP-MS Continuing Education Series;

Contact: Web site: http://www.cetac.com/news_events/icp-training.asp