

· 论 著 ·

微波消解-火焰原子吸收法测定乳汁中多种微量元素*

罗 阳¹, 张 雪¹, 唐远林², 黄君富¹, 府伟灵^{1△}

(1. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038; 2. 解放军后勤工程学院, 重庆 400016)

摘要:目的 建立微波消解-火焰原子吸收法检测人乳汁中多种微量元素的技术方法并对其条件进行优化。方法 应用具有压力控制功能的 Multiwave 3000 型微波样品制备系统, 对产如乳汁中铜、锌、钙、镁、铁和锰元素进行微波消解, 并采用火焰原子吸收法测定其元素的含量。探讨了混合酸体系和微波消解时间对微波消解乳汁结果的影响。结果 在混合酸体系 $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ 中, 当混酸比为 3:1、酸与样品体积比为 4:3、每步微波消解时间为 4min 的条件下, 消解效果最佳。在此条件下进行了火焰原子吸收测定消解产物的方法学评价。所得精密度试验中各元素相对标准偏差为 3.13%~4.98%, 回收试验的平均回收率在 96.17%~103.38%。各元素在线性范围内相关性良好($r>0.9998$)。结论 微波消解结合火焰原子吸收法测定母乳中微量元素, 具有快速、简便、经济、准确等特点, 适合临床检测。

关键词: 原子吸收; 乳汁; 微波消解; 微量元素

中图分类号: R446; R454.1; R592.6

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2008)04-0382-03

Determination of trace elements in human milk by Flame Atomic Absorption Spectroscopy with Microwave Digestion

LUO Yang, ZHANG Xue, TANG Yuan-lin, et al.

(1. Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of PLA, Chongqing 400038, China; 2. Logistical Engineering University of PLA, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish a method of quantifying main trace elements in human milk by flame atomic absorption spectroscopy with microwave digestion. **Methods** A microwave digestion method was developed for the determination of Cu, Zn, Ca, Mg, Fe and Mn in human milk, using the Multiwave 3000 microwave sample preparation platform system, and these trace elements were quantified by flame atomic absorption spectrometry after microwave digestion. Then the digestion solution and digestion time were optimized before detection. **Results** We got satisfactory analysis results with the average recovery varied from 96.17% to 103.38%, the CVs of imprecision were in the range of 3.13%—4.98% and the correlation coefficients of the linearity were over 0.9998 under the optimized analysis condition. **Conclusion** All these results prove this procedure to be a rapid, simple, economical and convenient method in quantifying trace elements in human milk.

Key words: AAS; human milk; microwave digestion; trace elements

母乳是婴幼儿最宝贵的营养来源,它在婴幼儿的发育过程中起着极其重要的作用。母乳热量高,所含蛋白质、脂肪、碳水化合物及其比例都最适合于婴儿的营养需要^[1]。与牛奶相比,母乳含有较多的维生素 A、C,且母乳中对人体有益的微量元素含量甚多(如钙、磷以及铜、锌、铁、锰、铬等),所以母乳喂养儿较少发生低钙血症。有文献报道^[2],母乳中含铁 0.13~1.5 mg/L,但其生物利用率高于牛奶。人乳铁和红细胞结合率亦高,可预防铁缺乏。因此,母乳喂养有着牛奶和其他人工奶粉喂养所不能替代的作用。然而,由于乳汁中微量元素的含量甚微,因而测定母乳中微量元素存在许多困难:首先是可获得的样品量有限;其次乳汁中所含成分复杂,从而使样品处理难度增大,而复杂的前处理又易导致样品污染。因此,如何快速、准确而又简便地测定母乳中各种微量元素的含量是本科亟待解决的问题。

原子吸收光谱法(atomic absorption spectrum, AAS)是测定生物样品中微量元素最简便实用的方法,它要求样品需经过一系列前处理过程,传统的前处理方法有干法灰化法和湿法消化法。干法灰化法是将固体试样与固体熔剂按一定比例混合,放在适当材料制成的坩埚内高温熔融,使欲测试样转变为可溶于水或酸的化合物,继而进行测定。此法具有简单、快速、干扰

少、污染小等优点,但不适用于易挥发的元素;湿法消化法是选用适当的溶剂,使被测组分变成可溶性物质。此法设备简单,但较为耗时、耗力,且极易导致被测物质的污染。微波消解技术是一种较新的样品消解技术,自 1975 年首次出现微波湿法溶解生物样品以来,此法得到了不断的发展与完善^[3~5]。与传统加热消解方法相比,微波消化样品的方法快速、准确、经济、污染小,并且能防止易挥发组分的损失。火焰原子吸收光谱法(flame atomic absorption spectrum, FAAS)由于其快速、操作简单的特点,成为原子吸收领域最为活跃的一个组成部分,已广泛应用于环境监控^[6~9]及生物组织^[5,10,11]中微量元素的测定。本文应用微波消解技术结合火焰原子吸收光谱法进行母乳中微量元素测定,通过优化消解条件,取得了良好效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 AAS Vario 6 型原子吸收分光光度计(德国耶拿公司);Cu、Zn、Ca、Mg、Fe 和 Mn 空心阴极灯(北京曙光光电光源仪器有限公司);HF-6100D 型空气压缩机(北京豪福机电技术开发应用有限公司);Multiwave 3000 型微波消解仪(奥地利 Anton Paar 公司)。

1.1.2 主要试剂 Cu、Zn、Ca、Mg、Fe 和 Mn 标准储备液

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2007BB5067)。△ 通讯作者

1mg/ml(国家标准物质研究中心,北京),使用时按需逐级稀释,标准品配好后即刻使用;HNO₃(优级纯);H₂O₂(优级纯);HClO₄(优级纯);H₂SO₄(优级纯);试验用水为 3 次蒸馏水。所用玻璃仪器均依次用 HNO₃、自来水、三蒸水清洗,4% HNO₃ 浸泡过夜备用。

1.1.3 试样制备 母乳样品来源于 2006 年 5 月~2007 年 3 月西南医院住院及门诊健康的泌乳期产妇。取样前对每位测试者进行局部清洁、消毒以减少污染。然后用真空采集器采集乳汁样品 5ml。所有的样品采集后编号并储存于 -20℃ 备用。

1.2 实验方法

1.2.1 样品消解过程 准确吸取 3ml 解冻后的乳汁并加入消化罐中,再加入 3ml HNO₃、1ml 的 H₂O₂。轻微振荡,静置 10min,然后拧紧消化罐的盖子,放于微波样品制备系统内,按表 1 的程序进行消解。消解完毕后,打开微波炉门,冷却至室温,用去离子水将消解液定容至 25ml 容量瓶中待测。

1.2.2 测定步骤 按照表 2 的仪器工作条件,将样品的标准溶液、样品液和空白溶液分别倒入 FAAS 仪器中测定,以吸光度为纵坐标,浓度为横坐标,仪器自动绘制工作曲线,并计算分析结果。

表 1 微波消解参数

步骤	功率(W)	升温时间(min)	保持时间(min)	风扇水平
1	400	4	4	1
2	600	6	4	1
3	0	0	5	2

2 结果与讨论

2.1 微波消解条件的选择

2.1.1 消解溶剂及比例的选择 准确吸取 3ml 解冻后的乳汁,以 HNO₃, HNO₃ + HClO₄, HNO₃ + H₂O₂ 和 HNO₃ + H₂SO₄ 作为消解试剂分别进行测定,微波消解条件见表 2。结果表明(表 3);HNO₃ 消化不完全,溶液浑浊,由于含有许多未消解成分,故未进行微量元素含量测定;HNO₃ + HClO₄, HNO₃ + H₂O₂ 和 HNO₃ + H₂SO₄ 都能使样品消化完全澄清,呈无色。三者中以 HNO₃ + HClO₄ 消解后测定值最高,说明此方法的消化效率最高。其次是 HNO₃ + H₂O₂,再次是 HNO₃ + H₂SO₄。三者间差异无统计学意义。但由于 HClO₄ 对聚四氟乙烯有较强的腐蚀性,会腐蚀消解管,故不宜采用。同时 H₂SO₄ 的沸点较高,用中高强度的消解管不能承受此温度,也不宜采用。4ml 的消解液消解后检测效果较 3ml 为高,因此对于 3ml 乳汁样品,分别加入 3ml HNO₃、1ml H₂O₂ 较为适宜。

2.1.2 消解加热时间的选择 为了消除微波消解后残留颗粒对火焰原子吸收的影响,本科将同一样品等分为 4 份,分别进行每步不同加热时间(2、3、4、5min)的消解,以比较不同消解时间对测定结果的影响。由于加热时间不同,消解液的澄清程度有显著差别。经过多次实验,结果表明,样品经预分解处理后,加热 4、5min 都可彻底消解,均无明显的颗粒物质出现,液体澄清透明,二者间无显著差异。为缩短测定时间,后续实验选择消解时间为 4min。

2.1.3 干燥方法的选择 为了检测在敞口容器中各种微量元素的损失或受外在污染情况,本科分别对同一样品的消化液进行了敞口容器和密闭容器的干燥比较试验。经检测,发现二者之间检测结果无显著性差异。然而,敞口容器所需的干燥时间要远小于密闭容器。因此,为了减少消化液的干燥时间,本科选择了敞口容器作为干燥器皿。

表 2 FAAS 测定微量元素的反应条件

元素	波长(nm)	灯电流(mA)	狭缝(nm)	燃烧器高度(nm)	空气流量(L/min)	乙炔流量 C ₂ H ₂ (L/min)	特征浓度(mg/Abs)
Cu	324.8	3	1.2	6	6.5	1.5	0.70
Zn	213.9	4	0.5	6	6.5	1.5	0.25
Ca	422.7	4	1.2	6	6.5	2.5	0.50
Mg	285.2	2	1.2	6	6.5	1.5	0.07
Fe	248.3	6	0.2	7	6	1.5	1.60
Mn	279.5	7	0.2	6	6	2	0.60

表 3 不同消解试剂及其总体积对测定结果的影响

酸总体积	消解试剂	元素含量(g/ml)					
		Cu	Zn	Ca	Mg	Fe	Mn
3ml	HNO ₃	0.36	2.10	0.26	0.13	0.55	0.53
	HNO ₃ + HClO ₄ (4 : 1)	0.79	2.50	0.57	0.23	0.95	0.79
	HNO ₃ + H ₂ O ₂ (3 : 1)	0.72	2.40	0.45	0.21	0.76	0.67
	HNO ₃ + H ₂ SO ₄ (2 : 1)	0.64	2.20	0.36	0.19	0.65	0.58
4ml	HNO ₃	0.50	2.11	0.70	0.27	1.01	0.92
	HNO ₃ + HClO ₄ (4 : 1)	0.87	2.72	1.06	0.74	1.23	0.91
	HNO ₃ + H ₂ O ₂ (3 : 1)	0.75	2.55	0.89	0.46	1.14	0.94
	HNO ₃ + H ₂ SO ₄ (2 : 1)	0.69	2.42	0.79	0.51	1.12	0.96

2.2 分析性能评价 为了检测本方法检测乳汁中各种微量元

素的有效性及其可靠性,进行了一系列测试以判断该方法的线

性、检出限、准确度和精密度的。

2.2.1 干扰试验 乳汁中营养成分含量众多,其基体较为复杂。以此进行微量元素测定必须判断其基体的影响程度。本试验在最佳测定条件下考察了乳汁样品中主要元素(Na、K、P、Pb、Cr)的干扰情况。结果表明,以下组分(均以 mg 计):Pb、Cr(0.5);Na(0.8);K(2.0);不干扰 Cu、Zn、Ca、Mg、Fe 和 Mn 的测定。结合相关文献^[12],各元素间的光谱干扰较小,元素干扰比达 10^{-3} 以下,因此,可忽略不计,可在一份样品制备液中分别测定各元素。

2.2.2 线性 对检测范围内 Cu、Zn、Ca、Mg、Fe 和 Mn 进行分别测定,得到火焰原子吸收测定乳汁中微量元素的线性结果,见表 4。所有元素的相关系数都在 0.999 8 以上,结果表明,在预实验选定的标准溶液浓度范围内,各元素浓度与吸光度均呈良好的线性关系。所有测定结果均已扣除试剂空白。

表 4 FAAS 测定各元素的线性范围

元素	范围(μg/ml)	线性方程	相关系数
Cu	0.025~1.0	$y=0.2463x+0.0021$	0.9999
Zn	0.100~1.0	$y=0.3532x+0.0042$	0.9999
Ca	0.010~1.0	$y=0.1863x+0.0023$	0.9998
Mg	0.010~2.0	$y=0.1437x+0.0014$	0.9998
Fe	0.025~1.0	$y=0.2528x+0.0015$	0.9999
Mn	0.025~1.0	$y=0.2463x+0.0014$	0.9999

2.2.3 检测限 以 2% 的硝酸溶液作空白,在上述优化的实验条件下重复测定空白溶液 12 次,用空白信号标准偏差的 3 倍计算各元素的检出限。检测结果见表 5。

表 5 FAAS 的精密性与最低检出限

元素	$\bar{x}(\mu\text{g/ml})$	$x(\mu\text{g/ml})$	RSD(%)	检出限(μg/ml)
Cu	0.4532	0.0143	3.16	0.01
Zn	2.6573	0.1324	4.98	0.06
Ca	0.3328	0.0145	4.36	0.04
Mg	0.2196	0.0105	4.78	0.06
Fe	0.6874	0.0215	3.13	0.01
Mn	0.4381	0.0195	4.45	0.01

2.2.4 精密度试验 对 Fe、Ca、Cu、Mg、Zn、Mn 的标准溶液分别测定 10 次,其均值与标准偏差见表 5。各元素相对标准偏差在 3.13%~4.98%。

2.2.5 准确度试验 由于微量元素在不同个体的乳汁中的分布范围很广,因此,合适的参考物质不易得到。本科则采用回收率来判断该方法的准确度。按照拟定的回收率试验方法,对乳汁中 6 种微量元素进行加标回收率试验,每种加标浓度重复测定 6 次,结果(表 6)显示,各项元素不同浓度加标回收率在 90%~109.33%,各元素平均回收率在 96.17%~103.38%,提示本方法的准确度较好。

本法采用微波高压消化罐消化处理产妇乳汁,并以 FAAS 测定了样品中 Cu、Zn、Ca、Mg、Fe 和 Mn 的含量。通过比较试验,优化了消化处理方法,效果令人满意。本法具有操作简单,精密度、准确度高、结果可靠等优点,可适用于临床上母乳中微量元素的检测。

表 6 各元素的回收率测试(n=6)

元素	样品含量(μg/ml)	加标量(μg/ml)	回收值(μg/ml)	回收率(%)	平均回收率(%)
Cu		0.050	0.053	106.00	99.22
	0.35	0.150	0.142	94.67	
		0.500	0.485	97.00	
Zn		0.100	0.106	106.00	101.70
	3.55	0.800	0.785	98.13	
		2.500	2.524	100.96	
Ca		0.030	0.029	96.67	99.56
	0.32	0.150	0.147	98.00	
		0.300	0.312	104.00	
Mg		0.010	0.009	90.00	96.17
	0.27	0.100	0.108	108.00	
		0.200	0.181	90.50	
Fe		0.050	0.053	106.00	100.59
	0.56	0.250	0.244	97.60	
		0.600	0.589	98.17	
Mn		0.050	0.049	98.00	103.38
	0.29	0.150	0.164	109.33	
		0.250	0.257	102.80	

随着人们生活水平的提高,人们越来越注意婴幼儿时期的营养供给。而母乳尤其是初乳又是不可替代的婴幼儿最重要营养来源^[13]。对母乳中各种微量元素的测定能直接反映婴幼儿的营养成分摄入情况。进而可以通过调节泌乳产妇的饮食结构,从而改变其乳汁中各营养成分的比例^[14]。这对于提高婴幼儿营养水平乃至提高整体国民身体素质具有重要意义。

参考文献:

- [1] Michalke B. Trace element speciation in human milk[J]. Pure Appl Chem, 2006, 78(1): 79.
- [2] Publications AZ. Mother's iron status, breastmilk iron and lactoferrin-are they related[J]. Eur J Clin Nutr, 2006, 60(7): 903.
- [3] 李晖,胡晓荣,程光磊. 微波消解原子吸收法测定骨头中的汞和硒[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(10): 1264.
- [4] 王丽鑫,胡晓荣,李晖. 微波消解-石墨炉原子吸收法测定大鼠组织中的硒[J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(11): 1447.
- [5] 赵爱东,翟学良,刘敬泽. 微波消解-Faas 法测定大鼠肝脏中的微量元素[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(11): 1893.
- [6] 朱霞石,朱小红,封克,等. 浊点萃取-石墨炉原子吸收光谱法测定环境样品中的痕量镉[J]. 分析化学, 2006, 34(7): 951.
- [7] 胡晓静,曾泽,卢琪,等. 石墨炉原子吸收法测定矿物饲料磷酸钙中铅镉铬[J]. 分析化学, 2006, 34(5): 744.

的兴奋性神经毒性作用^[6]。研究证实,烟碱对神经元的保护作用与 nAChRs 有关。

烟碱加入饮水中摄入后大鼠体内烟碱血浆浓度的变化与吸烟者吸烟后摄入体内的烟碱血浆浓度变化一样,口服烟碱血浆中的峰值与吸烟类似^[7]。通过口服途径,血浆中烟碱的浓度可以达到药理学要求,因而本科将烟碱加入饮水中作为研究的干预措施。文献报道,大鼠摄取烟碱在 5~10mg/d 或 0.7mg·kg⁻¹·d⁻¹ 的不同剂量下^[8]都具有改善学习记忆的能力。参考 Nordberg^[9] 等的文献,本实验饮水中烟碱的浓度为 5μg/ml,大鼠摄取的烟碱量约为 0.7mg·kg⁻¹·d⁻¹。

我国学者毕建忠等^[10]观察到大鼠海马注射 Aβ₂₅₋₃₅ 后,大鼠海马 CA1-CA4 区及齿状回神经元数量明显减少,神经细胞胞质浓染,核固缩。Aβ₂₅₋₃₅ 在体内可导致大鼠海马神经元损伤。Aβ₂₅₋₃₅ 注射于大鼠脑室或海马出现水迷宫学习能力及被动回避反应的损害,可复制出 AD 动物模型^[11]。因而,Aβ₂₅₋₃₅ 注射于大鼠脑室或海马的 AD 模型常用于 AD 治疗药物的观察、小胶质细胞炎症反应、Aβ 沉积、神经毒性等方面的研究。

在本实验中,通过 Western blotting、免疫组织化学染色发现,AD 对照组海马部位 α₇nAChR 的含量降低,免疫组化染色阳性细胞数减少,与正常对照组、烟碱 AD 组相比,差异明显,而烟碱 AD 组与 AD 对照组相比,海马部位 α₇nAChR 蛋白含量和免疫染色阳性细胞数增加。研究证实烟碱可增加海马部位 α₇nAChR 的表达。

在中枢神经系统,突触处神经递质的升高有利于学习记忆功能的保持和恢复。烟碱与突触前膜 α₇nAChR 后可增加乙酰胆碱、去甲肾上腺素、多巴胺等神经递质释放,提高突触处神经递质含量。因而,烟碱有改善 AD 大鼠认知功能、拮抗 Aβ 的神经毒性作用,其机制与 α₇nAChR 有关。

参考文献:

- [1] 严家川,周华东,蒋晓江,等. 烟碱对 AD 大鼠星型胶质细胞活性变化的影响[J]. 重庆医学 2007,36(16):1619.
- [2] Oddo S, Caccamo A, Green KN, et al. Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease[J]. Neuroscience, 2005, 132(1):101-111.
- [3] 龚治湘,崔利荣. 在线双毛细管-氢化物火焰原子吸收光谱法测定砷、锑、铋、汞、硒和锡[J]. 分析化学, 2006, 34(4):589.
- [4] 王瑜. 壳聚糖富集火焰原子吸收法测定水中痕量铜[J]. 分析化学, 2005, 33(6):872.
- [5] 何丽,张雪,府伟灵,等. 67 例重度烧伤患者血、尿中微量元素变化分析[J]. 重庆医学, 2006, 35(23):2142.
- [6] 陈华琼,张渝美. 重庆市 6681 例儿童血清中部分微量及宏量元素情况分析[J]. 重庆医学, 2006, 35(3):219.
- [7] Navarro-Blasco I, Alvarez-Galindo JI. Selenium content of Spanish infant formulae and human milk: influence of protein matrix, interactions with other trace elements and

102:3046.

- [3] Pe' rez SF, Sa' nchez RS, Rodrguez PM, et al. S-Allylcysteine prevents amyloid-β peptide-induced oxidative stress in rat hippocampus and ameliorates learning deficits[J]. Euro J Pharmacol, 2004, 489:197.
- [4] Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies[J]. Progr Neurobiol, 2002, 68:209.
- [5] Min SK, Moon IW, Ko RW, et al. Effects of transdermal nicotine on attention and memory in healthy elderly nonsmokers[J]. Psychopharmacology, 2001, 159:83.
- [6] Katsuki AH, Kume T. Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity[J]. Parkinsonism Related Disorder, 1999, 5:203.
- [7] Heranz CM, Terry AV. Repeated nicotine exposure in rats: effects on memory function, cholinergic markers and nerve growth factor[J]. Neuroscience, 2005, 130:997.
- [8] Pike CJ, Brudick D, Walencevicz AJ, et al. Neurodegeneration induced by β-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state[J]. Neurosci, 1993, 13:1676.
- [9] Nordberg A, Lindahl HE, Lee M, et al. Chronic nicotine treatment reduces β-amyloidosis in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease (APPsw)[J]. J Neurochem, 2002, 81:655.
- [10] 毕建忠,王萍,许顺良,等. 注射 Aβ₂₅₋₃₅ 后大鼠海马超微结构及 caspase-3 表达的改变[J]. 山东大学学报(医学版), 2005, 43(11):1000.
- [11] Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, et al. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies[J]. Progr Neurobiol, 2002, 68:209.

(收稿日期:2007-09-10)

(上接第 384 页)

- [8] 龚治湘,崔利荣. 在线双毛细管-氢化物火焰原子吸收光谱法测定砷、锑、铋、汞、硒和锡[J]. 分析化学, 2006, 34(4):589.
- [9] 王瑜. 壳聚糖富集火焰原子吸收法测定水中痕量铜[J]. 分析化学, 2005, 33(6):872.
- [10] 何丽,张雪,府伟灵,等. 67 例重度烧伤患者血、尿中微量元素变化分析[J]. 重庆医学, 2006, 35(23):2142.
- [11] 陈华琼,张渝美. 重庆市 6681 例儿童血清中部分微量及宏量元素情况分析[J]. 重庆医学, 2006, 35(3):219.
- [12] Navarro-Blasco I, Alvarez-Galindo JI. Selenium content of Spanish infant formulae and human milk: influence of protein matrix, interactions with other trace elements and

estimation of dietary intake by infants[J]. J Trace Elem Med Biol, 2004, 17(4):277.

- [13] Aycicek A, Erel O, Kocyigit A, et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula[J]. Nutrition, 2006, 22(6):616.
- [14] Bosscher D, Van Caillie-Bertrand M, Van Cauwenbergh R, et al. Availabilities of calcium, iron, and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions[J]. Nutrition, 2003, 19(7-8):64.

(收稿日期:2007-08-24)