

人血清铁的化学发光法测定

吕小虎 陆明刚 李喜青

(中国科技大学应用化学系, 合肥 230026)

提 要

研究了鲁米诺化学发光体系测定痕量铁的条件。在选定条件下测定铁(III)的线性响应范围为 $0.2 \text{ ng/ml}—0.1 \mu\text{g/ml}$, 检出限为 0.0014 ng/ml , 对含 0.5 ng/ml 的试样进行 10 次重复测定, 其结果的变异系数为 3.4%。对二十几种常见阴阳离子的干扰情况进行了试验和讨论。将本方法应用于正常人血清中微量铁的测定, 结果较满意。

关键词 鲁米诺, 化学发光, 血清, 铁

某些高能化学反应可导致电子激发态产物, 这些产物本身若能发射光子或传递其能量给其它发射物质, 便产生化学发光, 化学发光反应的发光强度决定于反应物分子或催化剂的浓度, 据此可进行定量分析。化学发光分析法具有设备简单, 灵敏度高, 线性响应范围宽和检测快速等优点, 因而已成功用于成分分析、临床分析和医学、分子生物学的研究^[1]。作者曾利用磺基水杨酸发光体系^[2]和酒石酸发光体系^[3]分别测定了人发及血清中的微量钴, 结果较为满意。本文以鲁米诺体系建立了人血清中微量铁的化学发光测定法, 方法具有灵敏度高, 选择性好等优点。

1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂

YHF-1 型液相化学发光分析仪(西安无线电八厂), XWT-106 型台式自动平衡记录仪(上海大华仪表厂), 25 型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

标准铁(III)溶液 $1.0 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$, 以硫酸铁铵 $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}]$ 来配制; 鲁米诺(北京化工厂生产)用 0.05 mol/L 的氢氧化钠配制成 $1.0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ 的贮备液; 过氧化

氢用含量不低于 30% 的 H_2O_2 (上海桃浦化工厂)配制成 0.1 mol/L 的贮备溶液。碱性鲁米诺溶液和过氧化氢需避光保存。上述 3 种试剂的稀溶液应当日配制, 配制各溶液均用 2 次重蒸水, 所用试剂纯度均在分析纯以上。

1.2 方 法

清洗反应池, 向其中加入 1 ml 碱性鲁米诺溶液, 启动记录仪走纸后, 再向反应池中加入 1 ml H_2O_2 溶液, 最后向反应池中注入 1 ml 铁(III)试液, 此时便产生化学发光。记录仪记录化学发光动力学曲线(即化学发光强度 I-时间 t 曲线)。以发光的峰值强度进行铁(III)的定量分析。

2 结果与讨论

2.1 鲁米诺- H_2O_2 体系的化学发光

鲁米诺(3-氨基邻苯二甲酰肼)在碱性条件下可被一些氧化剂氧化, 产生化学发光反应, 其最大光辐射的波长为 425 nm ^[4]。一些金属离子(如 Fe^{3+})对鲁米诺的化学发光有催化作用。碱性鲁米诺溶液在 Fe^{3+} 催化下被 H_2O_2 氧化时的化学发光动力学曲线如图 1。根据化学发

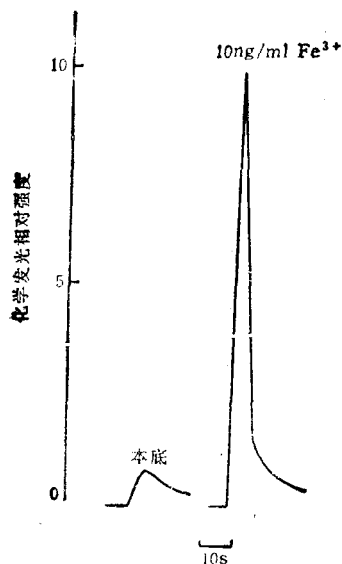


图 1 化学发光动力学曲线

鲁米诺浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$; NaOH 浓度为 0.05 mol/L ; H_2O_2 浓度为 $1.9 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$

光的峰值强度与一定范围内的铁(III)浓度有线性关系可以定量分析铁(III)。

2.2 测定条件的选择

2.2.1 试剂混合顺序 碱性鲁米诺、过氧化氢及铁(III)试液有多种混合方式。试验结果表明,试剂混合顺序以先将碱性鲁米诺溶液和过氧化氢混合,再向其中加入铁(III)试液为最佳,由这种混合顺序所得的化学发光强度最大,测定重现性也较好。

2.2.2 碱性鲁米诺溶液和 H_2O_2 的混合时间 在碱性鲁米诺溶液和 H_2O_2 溶液于反应池中混合后经历不同的时间,再注入铁(III)试液,测定化学发光的相对强度。结果表明混合时间不宜超过 8 min,否则,加入铁(III)试液时的化学发光强度会减弱。

2.2.3 反应液体积 固定各反应液的浓度,仅改变它的用量,结果表明,当反应液总体积小于 3 ml 时,随着反应液体积的增加,化学发光强度也增加,且递增的幅度较大;当反应液总体积大于 3 ml 时,它的改变对化学发光强度影响较小。考虑到实验的方便和反应池容积的限制,反应液总体积选择为 3 ml,即碱性鲁米诺溶液、 H_2O_2 溶液和铁(III)试液各取 1 ml 进

行试验。

2.2.4 氢氧化钠浓度 化学发光相对强度和氢氧化钠浓度的关系曲线有峰值出现,此点所对应的氢氧化钠的浓度为 0.05 mol/L ,本文选择该浓度。

2.2.5 鲁米诺浓度 在 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液中配制不同浓度的鲁米诺溶液,测定比较化学发光强度,结果表明,鲁米诺浓度在 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L} - 5.0 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 范围内,化学发光强度达到最大值,且基本保持恒定。本文选择鲁米诺的浓度为 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

2.2.6 H_2O_2 浓度 H_2O_2 作为化学发光反应中的氧化剂,其浓度的大小对反应速度和发光强度有影响。通过测定比较不同浓度 H_2O_2 时的化学发光相对强度,发现 H_2O_2 浓度选为 $1.9 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 时,化学发光强度达最大值。

2.2.7 铁(III)试液酸度的影响 用硫酸调节铁(III)试液的酸度,其它试剂采用已选择的浓度,分别测定不同酸度的铁(III)试液作催化剂的化学发光强度,结果表明其酸度以 $\text{pH} = 4$ 为宜。

2.3 测定铁(III)的线性范围

重现性及灵敏度在 $10^{-10} - 10^{-7} \text{ g/ml}$ 四个数量级范围内配制不同浓度的铁(III)标准溶液,在选定条件下按试验方法测定化学发光峰值强度,结果表明化学发光峰值强度与 $0.2 \text{ ng/ml} - 0.1 \mu\text{g/ml}$ 浓度范围内的铁(III)浓度有良好的线性关系,此方法的检出限,以不加铁(III)试液的反应液为本底,信噪比为 3:1 时,为 0.0014 ng/ml 。对含铁(III)的试样溶液,用此方法经 10 次重复分析所得结果的变异系数为 3.4%。

2.4 外界离子的影响

于上述实验条件下,对 1 ng/ml Fe(III) 进行测定,干扰不大于 $\pm 10\%$ 时,下述离子允许存在的浓度是: Bi(III) , Ca(II) , Mo(VI) 和 Br^- 为 $5 \mu\text{g/ml}$; PO_4^{3-} , ClO_3^- 和 NO_3^- 为 $10 \mu\text{g/ml}$; As(III) , Ba(II) , Pt(IV) 和 W(VI) 为 $1 \mu\text{g/ml}$; Au(III) , Mg(II) , Pb(II) 和 Zn(II) 为 $0.5 \mu\text{g/ml}$; Ag(I) , Cd(II) 和 Hg(II) 为 $0.1 \mu\text{g/ml}$; Cu(II) , Cr(III) , Ni(II) 和 Mn(II)

为 $0.01 \mu\text{g/ml}$; 而 Fe(II) 和 Co(II) 允许浓度较低, 分别为 7 ng/ml 和 0.005 ng/ml 。在处理样品时, 铁 (II) 几乎都被氧化成铁 (III), 故无需考虑 Fe(II) 的影响。实际样品中, 如果钴 (II) 含量较大, 应设法将它除去。

2.5 正常人血清中铁含量的测定

在 Fe(III) $1.0 \times 10^{-9} - 1.0 \times 10^{-7} \text{ g/ml}$ 浓度范围内配制若干个铁 (III) 标准溶液, 按试验方法测定化学发光峰值强度, 并制作工作曲线 (图 2)。

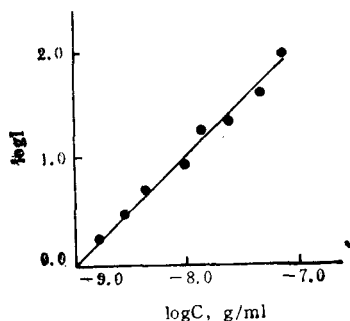


图 2 测定铁的工作曲线

取 0.5 ml 血清于一洁净的小烧杯中, 加 5 ml 浓硝酸, 在控温电热板上加热保持微沸至

近干; 加 5 ml 高氯酸于上述烧杯中, 加热保持微沸至白烟冒尽。定容于 50 ml 容量瓶中, 稀释 10 倍后进行测定, 结果见表 1。

表 1 正常人血清铁的测定结果

($n = 5$)

试 样	稀释样中 铁含量 (ng/ml)	变异系数 (%)	加入铁量 (ng/ml)	测得总 铁量 (ng/ml)	回收率 (%)
血清 A	1.4	4.8	2	3.2	93
血清 B	0.9	3.5	2	2.8	95
血清 C	1.5	3.2	2	3.3	91

由测定结果计算得血清 A、B 和 C 中铁含量分别为 $1.4 \mu\text{g/ml}$, $0.9 \mu\text{g/ml}$ 和 $1.5 \mu\text{g/ml}$ 。结果的变异系数小于 5%, 回收率试验也较满意。

参 考 文 献

- 1 陆明刚. 化学发光分析. 合肥市: 安徽科技出版社, 1986: 37
- 2 凌明夫, 陆明刚等, 分析化学, 1986; 14(12): 941
- 3 Minggang, L U, Xiaohu, L U, Fang Yin. *Talanta*, 1990; 37(4): 393
- 4 Paul D P. *Talanta*, 1978; 25(7): 377

欢迎订阅《生物化学杂志》

《生物化学杂志》为中国生物化学会主办的高级学术刊物, 主要刊登生物化学及相关学科国内外最新的科研论文和报告及研究简报, 面向国内外生化科技教学人员及研究生, 大学生。

《生物化学杂志》为双月刊, 每逢双月 11 日出版, 邮发代号 82-312, 每期定价: 5.50 元, 全年 6 期 33.00 元。

本刊首选为我国的核心期刊, 自 1985 年创刊以来连年入选为世界著名的六大权威系统之一的美国《化学文摘》(Chemical Abstract, CA) 的千种表中, 同时为国内多种检索系统收录。

本刊由北京市报刊发行局总发行, 全国邮局均可

订阅, 欢迎订阅《生物化学杂志》。

边远地区如有订不到者, 或错过邮局订阅者, 可向北京市学院路北京医科大学生物化学杂志编辑部联系 (邮政编码: 100083), 电话: 2091416, 从 1985 年创刊号起各期均可办理邮购。

邮局汇款: 北京学院路北京医科大学《生物化学杂志》编辑部

银行汇款

帐户名称: 生物化学杂志

开户银行: 中国工商银行北京市海淀区东升路分理处

帐 号: 891336-06