

- [6] Kalabina, L. V. et al.: *Chemical Abstracts*, 96 (17), Page 421, 1982.
 [7] Seitz, W. R. et al.: *Anal. Chem.*, 46, 188, 1974.
 [8] Williams, D. C. et al.: *Anal. Chem.*, 48, 478, 1976.
 [9] Lundin, A. et al.: *Clin. Chem.*, 28, 609, 1982.
 [10] Hercules, D. M. et al.: *Anal. Chem.*, 50, 22, 1978.
 [11] Werner, M. et al.: *Clin. Chem.*, 27, 268, 1981.

- [12] Adaling, O. et al.: *Anal. Biochem.*, 115, 302, 1981.
 [13] Jablonski, E. et al.: *Clin. Chem.*, 25, 1622, 1979.
 [14] Njus, D. et al.: *Anal. Biochem.*, 61, 280, 1974.
 [15] Osamu, S. et al.: *FEBS, Lett.*, 128, 242, 1981

[本文于1983年8月26日收到]

生物样品的消化及其元素测定的研究

杨 先 和

(北京市工业卫生职业病研究所)

生物样品元素的分析测定之前,必须进行消化处理。一般都需要针对不同样品和测定元素种类及其测定方法,采用不同的消化方法,而不能用同一种消化方法处理。

本文报道我们研究的一种简便易行的通用消化方法。用它成功地完成了血、肉、骨、皮、毛、粪便等100多种动、植物及食物样品的消化。并重点介绍本法消化液用于石墨炉原子吸收法的测定。

原理及操作

生物样品的消化,实质就是生物样品的氧化。处于基态的分子氧的氧化能力十分微弱,只有高能态的活性氧,才有强烈的氧化能力。我们的通用消化方法就是使样品处于水溶液环境中,利用高能态的活性氧氧化样品。

1. 试剂的选择

以30%的过氧化氢为主要试剂。 H_2O_2 是较强的低温氧化剂,它含有一个较弱的过氧键—O—O—,能在较低的温度下发生热均裂,产生出活泼的氢氧自由基 $HO\dot{+}OH \longrightarrow 2 \cdot OH$,它是一个最简单的过氧化物引发剂。由 H_2O_2 均裂产生的初级自由基($\cdot OH$),在适当条件下,又能与体系中的 H_2O_2 发生诱导分解,诱发出系列自由基链锁反应,而产生出具有高能态的活性氧。因此在消化过程中 H_2O_2 不仅作为活性氧的提供者,而且是自由基反应的引发剂。

此外 H_2O_2 与 H_2O 一样是一个非常好的溶剂。使用 H_2O_2 一般不会引进新的元素干扰。

H_2O_2 只有在酸性溶液中才是一种强氧化剂,因而又选用浓硝酸试剂。特别是 HNO_3 本身也具有强氧化性,它分解出来的 NO_2 ,具有传递电子的作用。 HNO_3 可以通过 NO_2 和还原剂交换电子,加快反应速度,因而具有催化氧化的作用。 HNO_3 除了能增强氧化性能外,还能使样品酸化,同时具有稳定 H_2O_2 的作用。此外,几乎所有的硝酸盐都溶于水,受热都能分解。所以在本法中 H_2O_2 与 HNO_3 配合使用,能使样品消化到清彻、透明、无色,并能长期保存。

2. 在密封罐内消化

在密封罐内消化样品,目的是使 H_2O_2 处在平稳状态下分解,以保证活性氧持续不断地产生。 H_2O_2 的热均裂需要一定的温度。由 H_2O_2 热均裂或诱导分解产生的寿命很短的活性氧,只有在它与样品分子发生有效碰撞时,氧化反应才能发生。同时,由引发剂均裂出来的初级自由基,只有在对基质发生有效碰撞时,才能诱发链锁反应。而密封罐内可保温、加压,就能大大提高有效碰撞几率。实验表明,以150℃为最好。当温度低于120℃时,样品消化不好,但温度也不宜过高。

现有密封罐,一般由聚四氟乙烯坩埚和不锈钢(或铝)外套组成。因密封罐需经常开启、关闭,而聚四氟乙烯坩埚经反复高温、高压作

用,要发生变形,会破坏原有的密封性能,我们对此作了改进:

(1) 使聚四氟乙烯坩埚与不锈钢外套之间完全采用滑动配合,以借助外套固定坩埚的形状。

(2) 用不锈钢盖代替现在普遍采用的聚四氟乙烯坩埚盖。在不锈钢盖内配置氟橡胶O型圈,然后再盖一张聚四氟乙烯薄膜,从而提高了密封性能。

(3) 在不锈钢盖上方沿O型圈加一个凸起的台阶,以减少开启和关闭时的摩擦力。

(4) 在不锈钢套的底面开一个小孔,使之与大气接通。

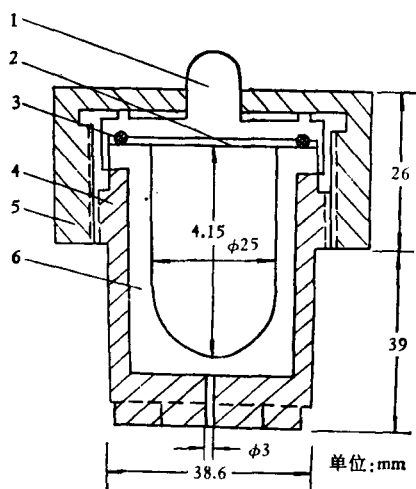


图1 密封罐结构图

3. 消化操作

不论是干枯生物体还是生物活体样品,都可直接放入密封罐内的坩埚中(不需要干燥、破碎等处理),准确加入所需试剂,将盖拧紧,放入烘箱中于 150°C 保温二小时左右,自然冷却至室温后摇匀开盖,,勿需冲洗等即可取溶液直接测定。不足一克的一般样品只需加入一滴 HNO_3 及 $4\text{ml H}_2\text{O}_2$ 。某些样品 HNO_3 的加入量及先后次序需有变动,一般 $4\text{ ml H}_2\text{O}_2$ 中加 HNO_3 零到数滴。

含蛋白质较多的动物样品,加入 H_2O_2 之前,应先加入少许 HNO_3 浸润。尤其是血液一

类,若不事先酸化,当加入 H_2O_2 后立即剧烈反应,并鼓大气泡,使样品无法消化。对于骨、牙等一类,也应先加入少许 HNO_3 使样品酸化,放置一段时间再加入 H_2O_2 ,则消化就很容易。

植物样品的消化正好相反,一般都可先加 H_2O_2 再加 HNO_3 。例如苹果皮及干红辣椒皮类,由于表面含有一层蜡及油脂类物质,如果先加入 HNO_3 后加入 H_2O_2 ,则样品很难消化。总的说来酸度过大,对酯类物质的消化是不利的。以脱脂棉和原棉为例,脱脂棉的消化十分容易, HNO_3 的加入量及加入的先后次序都不影响消化效果;但原棉,如酸度过大,往往消化不好,一般在 $4\text{ml H}_2\text{O}_2$ 中,最好只加入一滴 HNO_3 ,甚至可以不加酸,只用单一的 H_2O_2 消化。

含脂量特别高的样品,如菜油、花生油及猪板油等,最好先乳化,使之成为均匀的乳化液,然后借助原子吸收及 ICP 等分析仪器,测定样品的元素。

本文所用的乳化方法,是先将样品消化,使样品中除脂肪以外的其他成份全被氧化。为了增加乳化液的稳定性,在消化中尽可能减少 HNO_3 的用量,一般在 $4\text{ml H}_2\text{O}_2$ 中加入 $0.5\sim 1$ 滴 HNO_3 ,待保温消化后,直接在消化液内再加入 $1\sim 2$ 滴浓氨水,使溶液的 $\text{pH} \geq 7$,拧紧密封罐盖,于 90°C 左右保温一至二小时,让其自然冷却到室温,即得到稳定均匀的乳化液。在乳化过程中,还可加入数滴乙醇,起消泡剂的作用。本乳化液是一种乳液聚合反应物,因而比较稳定均匀。

4. 元素测定

我们对密封罐进行了改进,使其密封性能好,操作简便,试剂用量少、空白值低、回收率高,这都是密封罐消化样品所具有的独特优点。因选用 H_2O_2 为主要试剂,受热后容易分解,因而基体干扰小,适合于原子吸收、ICP、火焰光度计等分析仪器的测定。此外,选用 H_2O_2 及 HNO_3 便于采用化学方法消除干扰,也适于开展其他方法的多元素测定。实验表明,本消化液又特别适用于石墨炉原子吸收法的测定。

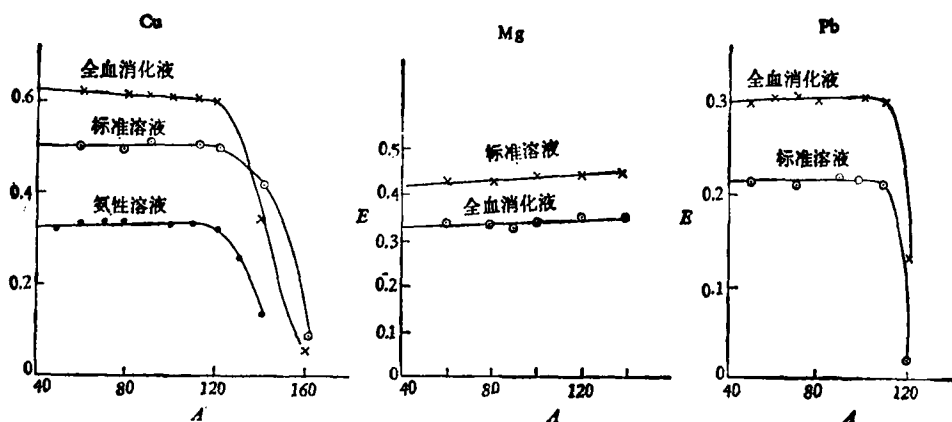


图2 全血消化液及氨性乳化解测定 Cu、Mg、Pb 时的灰化温度曲线

(1) 仪器的操作,基本上可按标准稀硝酸水溶液的条件选择。但在干燥与灰化之间需加 15 秒斜坡升温。对于乳化解斜坡升温的时间,应适当延长,一般为 30 秒左右。

(2) 消化不同的生物样品时,硝酸用量需有变动。本文取七份 200 μ l 全血样品消化,使消化液中硝酸浓度分别为 1.25%、2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%、15.0%,然后连续 14 次测定七个样品的铜,其标准偏差系数为 4.5%。当硝酸浓度在上述范围变动时,对石墨管无明显损伤。

(3) 取测定铜的全血消化液,用去离子水稀释后,测定镁取得了满意的结果(全血中铜含量约 1ppm,镁约 40ppm)。对五份含镁量相同,而试剂稀释倍数不同的标准溶液,连续 19 次测定,其标准偏差系数为 6.6%。这说明本消化液可以用水稀释后再测定。这利于测定同一消化液内含量不同、灵敏度不同的多种元素。

(4) 对某些生物样品,虽经本法消化后仍有可能残留以某种形式存在的有机物。因消化液中有大量 H_2O_2 存在,可借助于石墨管内的高温(300 $^{\circ}$ C 左右)进一步反应,使之彻底氧化,从而消除了有机物的干扰。

从图 2 看出消化液与标准溶液,具有完全相同的灰化温度曲线。当灰化电流由 40A 分别升到 120A、140A、110A 时, Cu、Mg、Pb 的灰化温度曲线一直处于平台状态,这说明已基本上消除了有机物的干扰。

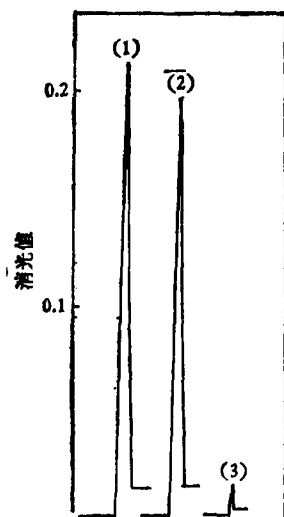


图3 吸收线与非吸收线峰值比较

峰(1)是全血消化液铜的吸收线峰;峰(2)是用氘灯扣背景后的吸收线峰;峰(3)是非吸收线峰

通过对图 3 的峰 (3) 进一步研究,推知此峰可能是血液样品所含氯化物等产生的分子吸收。因峰(3)与氯化物一样,存在一个灰化温度曲线。同时用头发消化液作了非吸收线测定,发现头发的非吸收线峰比全血小得多,几乎可以忽略不计,这可能是因头发中诸如氯化物一类容易产生分子吸收的物质,比血液中少得多。此外还分别用镁灯、铅灯等重复上述实验,情况基本相同。说明本消化液用于石墨炉原子吸收,已基本消除了有机物干扰。另外,经本法消化后的全血消化液连续进样 300 至 400 次后,石墨管内外仍清洁如新,每次进样后空烧均无

表 1

测定元素	消 光 值											标准偏差系数%
Cu	0.290	0.290	0.290	0.290	0.300	0.310	0.310	0.295	0.300	0.300	0.300	2.76
Mg	0.375	0.365	0.365	0.385	0.370	0.370	0.375	0.375	0.385	0.375	0.380	1.83
Pb	0.026	0.028	0.028	0.027	0.028	0.024	0.028	0.026	0.028	0.027	0.026	4.86

残余峰,也说明对有机物破坏比较彻底。

(5) 本消化液用于石墨炉原子吸收法测定,具有测定值稳定、重现性好等优点(见表 1、表 2)。

表 1 是在同一全血消化液内分别对 Cu、Mg、Pb 连续 11 次测定的消光值。

表 2 是在同一血液样品中,分别取五份 200 μ l 全血消化后,测定 Cu、Mg、Pb 的含量。

表 2

测定元素值 \ 样品号	1	2	3	4	5
Cu μ g/100ml	88	86	87	86	87
Mg mg/100ml	3.8	3.9	4.0	4.0	4.5
Pb μ g/100ml	11	8	11	7.5	10

参 考 文 献

- [1] Walter, C. S. et al.: *Hydrogen Peroxide*, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1955.
- [2] 浙江大学等合编:《高分子化学》,化学工业出版社,1980,北京。
- [3] Philip, L. Altman: *Biology Data Book* (2nd ed.), 1751, 1974.

[本文于 1983 年 8 月 17 日收到]

脂质过氧化作用的新指标——呼气 及液上气体中低级烃类的测定

丁 军 凯 魏 奉 群

(辽宁省医学科学院基础医学研究所,沈阳)

一、前 言

脂质过氧化作用 (Lipid peroxidation, 简称 LPO) 原指脂肪、油等在空气中自动氧化酸败的现象。实质上是脂质中多元不饱和脂肪酸受氧化作用形成多元不饱和脂肪酸过氧化物的过程。

机体内由于酶的和非酶的脂质的氧化反应也可以生成过氧化脂质。已经确认体内脂质过氧化作用的机制是自由基引发的链反应^[1]。由于机体内存在一系列的保护系统: 如谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX), 维生素 E, 过氧化氢分

解酶, 微量元素 Se 等等, 可分解或去除过氧化脂质。但是在一定条件下, 由于体内正常或异常的化学变化所发生的氧化还原反应, 促使机体受到活性氧 ($\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{O}_2^-$, $\text{R}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$) 作用, 生成过量的过氧化脂质, 超越了体内保护系统的分解和清除能力, 这样就对生物体活性物质的脂质、蛋白质、核酸、多糖及其构成组分发生伤害作用, 如自由基导致 DNA、RNA 交联, 导致蛋白质、氨基酸的氧化破坏或交联, 自由基对多糖高分子的氧化降解以及自由基诱发的脂质过氧化, 能造成生物膜损伤, 细胞变性乃至发生组织机能的下降^[2-7]。