维普资讯 http://www.cqvip.com

239~241

荧光法检测血清硒与组织硒

第一医院普外科 江康莹 吴凯南
中心实验室 唐文淦

R446.112

提 要 本研究应用2,3—萘二胺(DAN)与硒反应生成5,6—苯并苎硒脑的荧光分光光度法检测血清硒与组织硒,通过方法学的实验研究,认为本法线性范围宽(0.05μg—1.50μg/ml)r为0.999,CV值为1.09%(n=8)、回收率为99.97%,是一种较为灵敏、准确、重复性较好的定量检测法。我们对30例正常健康人的血清硒及24例正常健康人的乳腺组织测得其平均值分别为0.076±0.012μg/ml和1.323±0.40μg/g组织,与国内学者报导的基本一致。

关键词 硒、荧光测定法、质量控制。
中图分类号 R446.112

硒作为人体必需的微量元素与人类健康和肿瘤有密切关系。正确评价体内硒状态对人类健康及癌症的防治有重要意义。荧光法测定硒灵敏度高,但存在易污染、易损失的问题,因其含量甚微,检测中稍有误差即会影响对体硒的判断。因此、严格操作步骤才能确保实验结果的科学性、可靠性。本文旨在对荧光法检测血清硒、组织硒的方法学进行初步评价并对其影响因素加以讨论。

材料与方法

1. 主要仪器和试剂

(1)荧光分光光度计(岛津RF—540)

(2)电子天平(AEL200型 岛津)

(3)2,3—二氨基萘(DAN AR 98%英国)

(4)标准品高纯硒粉(99.999%)NO.85—18—13(四川峨嵋半导体厂)

(5)其它试剂

去离子水(自己置备);

消化剂(硝酸:高氯酸=2:1);

盐酸(1M);

氨水(7.5M);

盐酸羟胺;

甲基橙掩蔽试剂(EDTA、盐酸羟胺、甲基橙);

环已烷;

以上试剂均为优级纯或分析纯,经测定无荧光杂质。

2. 实验步骤

参照Bayfield和Wafkinson等方法[1,2]并加以改进。

(1)样本收集 采血器材、取样小瓶均置10%硝酸浸泡24小时,其它玻璃器材先经铬酸洗液浸泡24小时,再用10%硝酸浸泡24小时,经自来水洗净后再用去离子水冲洗三遍,烘干备用。抽取空腹血样2ml,静置待血块回缩后离心,吸取血清0.25ml置于划有10ml刻度的25×150mm的大试管内,加入消化剂3ml放置过夜;乳腺癌组织标本于手术时摘取、

维普资讯 http://www.cqvip.com

冷冻干燥后约48小时取出，在电子天平上称取冻干组织约30mg，置于划有10ml刻度的25×150mm大试管内，加消化剂3ml放置过夜。

(2)消化还原　将存有待测物的试管置于砂浴中，徐徐加温到180℃消化，再逐渐升温到210℃，在此温度保持2.5小时，待样本完全消化后呈淡黄色液体并伴有白色浓烟止。取出试管，待其自然冷却后，加5NHCL0.4ml，再置180℃砂浴中持续15分钟，使硒还原。

(3)蒸硒脑生成　在上述消化、还原完毕冷却后的样品液内加入掩蔽试剂2ml，滴加7.5MNH$_3$·H$_2$O至溶液呈黄色，再滴加1MHcl到溶液出现明确的粉红色，此时溶液的pH大约为3，加去离子水至10ml刻度。在暗室内加新鲜配置的0.1%DAN1ml于样本中，调整PH至1.8左右，置50℃水浴中保温30分钟，使苯硒脑生成完全。

(4)萃取　待上述液体冷却后，加环已烷5ml，在旋涡式混匀器上振荡30分钟，萃到蒸硒脑于环已烷中，吸取上层有机溶剂，在荧光光度计上测定其荧光强度。

(5)测定条件

仪器条件的选择，取0.4μg/ml标准硒溶液0.75ml加去离子水0.25ml，按样品一样进行消化、萃取等步骤处理后，于RF—540荧光分光光度计上进行扫描选择最灵敏峰谷。激发波长(EX)371NM；发射波长(EM)为517nm；仪器狭缝均为10mm，比色杯的光径为10mm。放大倍数为50X。

在Ex371nm，EM517nm条件下分别测定样本的荧光强度，然后在标准曲线上查阅其含量。

1.标准曲线的绘制

将硒标准液(0.4μg/ml)用去离子水稀释成0.05、0.100、0.150、0.200、0.300、0.400μg/ml6种不同浓度，然后加3ml消化剂，按样品消化处理等步骤进行，最后按上述测定条件测定各管的荧光强度。见表1。

表1

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
每管内硒含量ug/ml	–	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40
荧光强度	2.3	11.00	20.20	28.00	37.00	54.00	68.00

为进一步观察比较高浓度的硒测定的线性范围，我们只设计了从0.5—1.50μg/ml的标准曲线。由于每管硒浓度的增加其荧光强度也对应增大，为了使荧光强度的读数不超过仪器所规定的200.00的范围，故我们在测定高浓度硒各管的荧光强度时将测定条件中的放大倍数改为25X，其结果如表2。

表2

试管编号	1	2	3	4	5
每管内硒含量ug/ml	–	0.50	0.75	1.00	1.50
荧光强度	0.20	41.20	61.20	81.20	118.60

以上两组实验数据经统计学分析，硒浓度和其相对应的荧光强度之间的相关系数(r)均为0.9999，认为该测定方法对硒浓度的分析范围较宽，线性也好。

精密度和准确度测定

(1)精密度测定。取一份混合血清重复测定8次，所得数据如下：(表3)

表3　重复性试验

编　号	1	2	3	4	5	6	7	8
荧光强度值	13.00	12.80	13.00	12.90	12.80	13.20	13.10	13.00
硒浓度ug/ml	0.064	0.063	0.064	0.063	0.063	0.065	0.065	0.064

$\bar{x}=0.0638$　　$sD=0.0007$　　$CV=1.09\%$

(批内)

同一份血清每日测一次，共7次，$\bar{x}=0.0718$

$sD=0.0009$

批间　$CV=1.25\%$

(2)准确度测定：于已知硒浓度为0.0618μg/ml的混合血清中分别加入硒0.05μg、0.10μg、0.20μg，为减少测定中的随机误差，同时均作双份测定，测得其回收率为96.60%、100.00%、104.35%，平均回收率为100.10%。见表4

表4　回收率试验结果

	血清硒含量					
	0.068		0.068		0.068	
加入硒量ug/ml	0.05	0.05	0.10	0.10	0.20	0.20
实测值ug/ml	0.1098	0.1094	0.1610	0.1672	0.2720	0.2690
回收值ug/ml	0.048	0.048	0.099	0.101	0.210	0.2012
回收率%	96.00	96.00	99.00	101.00	105.00	103.50

平均回收率为100.1%

维普资讯 http://www.cqvip.com

3. 正常参考范围

30 例健康人血清硒检测结果为 0.076±0.012μg/ml；24 例正常乳腺组织检测结果为 0.0132±0.40μg/克组织。

我们测得 20 例健康人血清硒浓度的结果与国内外报道的基本一致，[7][8][9]，但比西方发达国家报道的偏低[10]，这可能与饮食有关。

4. 测定中应注意的问题

(1)样本的消化是影响本法测定结果的首要因素，原则上标本加消化剂后要放置过夜，籍以除去大部分有机物质；加热消化时，温度应缓慢上升，防止飞溅引起硒的损失。当脐白烟出现太快时，除消化不全外，还会造成样本的损失[3]。加温过急还会引起爆炸的危险[4]。

(2)硒的测定结果是否全部反映了硒含量，这与六价硒还原为四价硒是否完全密切相关，我们采用 5MHcl 进行还原反应的进行。有学者提出用 $NH_2OH.HCl$ 进行还原反应，我们在实验中通过比较，发现后者可造成硒的损失，与 *Grant*[5] 等学者观察的结果相一致。

(3)pH 调试准确与否直接影响硒与 DAN 形成苯硒脑的反应。一般认为最适 pH 范围为 1.5～2.0 之间，酸度增加，反应速度减慢，降低酸度可加快反应速度，但也相应加速了 DAN 的氧化与分解，同时也使反应的选择性降低[6]，我们用间隔 0.5 的精密 pH 试纸调试 pH，手续方便，效果较好。

(4)2,3—二氨基萘(DAN)的纯化：市售的 DAN 虽然标明纯度为 98%，但配制的试剂色素较深，因此试剂空白的颜色也较深，对测定结果有影响，故必须加以脱色提纯后再用。

(5)环已烷萃取苯硒脑是否完全，直接影响测定结果。我们在实验中观察到持续振荡 30 分钟是萃取的最适条件。(表 6)。

(6)我们采用 50℃，将测定管进行孵育 30 分钟，使笨硒脑生成完全；萃取振荡后应离心或静置 30 分钟，使环已烷分层完全。分层后立即测定，防止环已烷挥发而影响测定结果。

表 6　孵育温度与萃取时间的回收率

孵育温度(℃)	萃取时间(min)	回收率(%) 孵育时间(min) 10	20	30
25	10	82.0	84.3	85.4
	20	86.2	88.0	88.5
	30	88.0	90.2	89.4
50	10	90.1	93.0	95.5
	20	94.0	98.0	99.0
	30	93.5	98.5	100.0

(7)每次样本测定时再加做一组 0.05—0.20μg/ml 硒的标准曲线，作为样本的质量控制，以保证测定结果的准确性。

(致谢　本实验承蒙重庆医科大学附属第一医院中心实验室有关同志、基础部核医学和统计教研室等单位大力支持和合作，在此一并致谢。)

参 考 文 献

1. Bayfield RF, Romalis LF. Ana J Bioch. 1985;(144):569
2. Wafkinson JH. Ana J Chem. 1966;(38):92
3. 任大林，等. 中华预防医学杂志，1989;23(3):159
4. *Pesce AJ, et al. Method in Clinical Chemistry*. 1987;534
5. Grant AB N—Z—J—Scy, 1981;(24):65
6. 徐辉碧. 生物微量无素—硒，华中工学院出版社 1983;155
7. 扬冬华，等. 第三军医大学学报. 1988;4(6):462
8. 康格非，等. 临床生物化学，人民卫生出版社 1989;105
9. Sohunsson.《国外医学》医学地理分册，1990;(3):101
10. Schrauzer GN et al. Jpn J Cancer Res. 1985;(76):374