

含铜节育器植入家兔体内血清铜离子含量测定

徐小玲,何开勇,潘望平,吕晓君,胡远华

(湖北省食品药品监督检验研究院,武汉 430064)

摘要 目的 建立植入含铜节育器家兔血清铜离子含量测定方法。方法 采用硝酸对血清样品进行微波消解制样,钪(Sc)、铟(In)作为内标补偿基体效应,采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS法)测定兔血清中铜的含量,分析统计铜离子的释放和代谢规律。结果 家兔放置含铜节育器后,在不同采血时间点,血清铜离子浓度维持在较低且恒定的范围。加样回收率为98.7%~113.3%,RSD均<5%。结论 该方法操作简便、快速,结果可靠,可用于家兔血清铜离子的测定。

关键词 含铜节育器;铜离子;电感耦合等离子体质谱法

中图分类号 R979.2;R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)06-0614-03

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.06.006

Determination of Copper Ion in Rabbit with Implantation of Copper Intrauterine Device

XU Xiaoling, HE Kaiyong, PAN Wangping, LYU Xiaojun, HU Yuanhua (Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China)

ABSTRACT Objective To develop a method for determination of serum copper ion in rabbit with implantation of copper intrauterine device. **Methods** At different time points after implantation, the serum copper ion concentrations were determined by microwave digestion-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using scandium (Sc) and indium (In) as internal standards to compensate sample matrix effects, and the pharmacokinetics parameters were calculated in order to reflect copper ion release and metabolic rule. **Results** The serum copper ion concentrations were kept at a low and stable level. The recoveries were in the range of 98.7%-113.3%, with the relative standard deviations of less than 5.0%.

Conclusion The analytical method is simple, fast, and can be used for the determination of serum copper ion in rabbit.

KEY WORDS Copper intrauterine device; Copper ion; Inductively coupled plasma mass spectrometry

宫内含铜节育器(Cu-IUD)是我国育龄妇女最主要的避孕措施,它具有安全、长效、简便、可逆、经济等优点。其抗生育效应是通过铜被宫腔液腐蚀溶解产生铜离子(Cu^{2+}), Cu^{2+} 的生物毒性能抑制或杀灭精子,同时对孕卵形成、胚胎着床等各环节起抗生育作用,从而大大提高避孕效果^[1-3]。微量元素是维持人体正常代谢和生命活动的重要物质,微量元素的缺失和富集均可引起多种疾病^[4]。电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)是一种新型元素分析技术,具有极高的检测效率,是痕量、超痕量元素分析领域最先进的方法之一^[5]。笔者建立微波消解-ICP-MS法测定家兔血清中 Cu^{2+} 含量,以植入新型含铜节育器的家兔为研究

对象,通过连续监测3个月家兔体内的 Cu^{2+} 动态变化,考察血清 Cu^{2+} 是否会在体内产生蓄积,为临床的安全应用提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通级雌性日本大耳白兔8只,体质量2.5~3.0 kg,武汉生物制品研究所有限责任公司提供,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2012-003,合格证号42010000000814。适应性饲养1周后开始实验。

1.2 样品与试剂 含铜宫内节育器(硅胶:铜=3:1),批号:140901,规格:54 mg,常州尚泰医疗科技有限公司;色谱纯硝酸(Merck公司);铜单元素标准溶液($1\,000\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,批号:159036-2,国家有色金属及电子材料分析测试中心);水由simplicity超纯水机(美国millipore公司)制备。

1.3 仪器 XS series2 电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS,赛默飞世尔科技有限公司)。MARS6 微波消解仪(美国CEM公司);-80℃超低温冰箱(海尔公司);5424 高速台式离心机(德国Eppendorf公司)。玻璃容器均用30%硝酸浸泡过夜,洗净后晾干备用。

收稿日期 2016-04-08 修回日期 2016-09-06

作者简介 徐小玲(1981-),女,湖北通山人,主管药师,硕士,主要研究方向:药理、毒理及临床前药代动力学。电话:027-87271327, E-mail:117723313@qq.com。

通信作者 胡远华(1963-),男,湖北监利人,副主任技师,学士,主要研究方向:药物分析及质量控制。电话:027-87895873, E-mail:huyuanhua@126.com。

2 方法与结果

2.1 ICP-MS 的工作参数 以锂 (Li), 铟 (In), 钴 (Co), 铀 (U) 调谐液对仪器最优化, 工作参数: 雾化室温度 2 ℃; 提升时间 15 s; 稳定时间 15 s; RF 功率 1 250 W。用钪 (Sc)、In 作为内标物以校正基体效应。

2.2 血清样品采集和处理 每只家兔行含铜节育器放置术后放入笼中喂养。分别于术前 1 h, 术后 1, 3, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70, 84 d 自耳缘静脉采血, 每次每只 2 mL; 室温下静置 1 h, 800 × g 离心 10 min, 血清于 -80 ℃ 冰箱保存备用。精密吸取融化后血清样品 0.2 mL, 置耐压耐高温微波消解罐中, 准确加入 3% 硝酸溶液 5 mL, 盖好聚四氟乙烯罐盖, 放入消解仪的转盘中, 按优化后的微波消解条件 (表 1) 进行消解, 消解液于 110 ℃ 除酸 40 ~ 50 min 后, 转移至 10 mL 量瓶中, 少量水洗涤消解罐, 合并至量瓶中, 用水稀释至刻度, 混匀, 即为待测样品溶液。

表 1 微波消解条件

Tab.1 Microwave digestion procedure

步骤	功率/W	升温时间/min	温度/℃	保持时间/min
1	1 600	5	130	10
2	1 600	5	150	15
3	1 600	5	185	25

2.3 线性关系考察 精密量取铜的单元素标准溶液 (1 000 μg·mL⁻¹) 1 mL, 置于 200 mL 量瓶中, 用 3% 硝酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得 5 000 μg·L⁻¹ 的铜离子标准储备液 I, 用 3% 硝酸溶液稀释制成含铜离子为 100, 50, 20, 10, 5, 1 μg·L⁻¹ 的系列铜离子标准溶液。由蠕动泵分别导入仪器, 照“2.1”项测定, 计算机自动绘制标准曲线。Y = 3 919.3X + 10 306.2, r = 0.999 6。结果表明: 铜离子在 1 ~ 100 μg·L⁻¹ 浓度范围内呈良好的线性关系。

2.4 检测限 取 3% 硝酸溶液作为空白溶液导入仪器, 照“2.1”项连续测定 10 次, 并以 10 倍标准偏差计算铜离子的检测限, 结果为 0.026 μg·L⁻¹。

2.5 加样回收实验 精密量取铜离子标准储备液 I 8, 20, 50 mL, 置于 100 mL 量瓶中, 用 3% 硝酸溶液稀释制成含铜为 400, 1 000, 2 500 μg·L⁻¹ 铜离子标准溶液。随机选取 10 份空白血清样品各 0.2 mL, 1 份不加标, 另 9 份分别加入上述 3 种不同浓度的铜离子标准溶液 0.2 mL, 每个浓度平行制备 3 份, 充分混匀后, 照血清样品溶液的方法制备加样回收实验溶液, 分别导

入仪器测定, 在线加入内标, 按标准曲线法计算铜的含量, 并计算回收率。结果平均回收率 98% ~ 113%, RSD 均小于 5%, 见表 2。

表 2 加样回收实验结果

Tab.2 Results of recovery test

原有量	加入量	测得量	回收率	平均回收率	RSD
(μg·L ⁻¹)			%		
347.9	400	781.1	108.3	113.3	3.9
347.9	400	813.9	116.5		
347.9	400	808.7	115.2		
347.9	1 000	1 413.9	106.6	109.3	3.6
347.9	1 000	1 421.8	107.4		
347.9	1 000	1 486.9	113.9		
347.9	2 500	2 885.4	101.5	98.7	4.5
347.9	2 500	2 687.9	93.6		
347.9	2 500	2 872.7	101.0		

2.6 精密度实验 取空白血清 0.2 mL, 置耐压耐高温微波消解罐中, 加入 1 000 μg·L⁻¹ 铜离子标准溶液 0.2 mL, 照“2.2”项制备成含铜离子浓度为 20 μg·L⁻¹ 的血清样品溶液, 导入仪器连续进样测定 6 次, 结果 RSD 为 0.99%, 表明方法的精密度良好。

2.7 稳定性实验 在空白血清中分别加入 400 和 2 500 μg·L⁻¹ 的铜离子标准溶液, 照“2.2”项制备成含铜离子浓度分别为 8 和 50 μg·L⁻¹ 的血清样品溶液各 3 份, 室温下放置 24 h 后, 测定铜离子含量, 测得量占加入量的百分比均在 98.4% ~ 112.9% 之间, 提示处理的血浆样品室温下放 24 h 内稳定性良好。

2.8 样品测定 按“2.1”项仪器参数, 将待测样品溶液导入仪器中测定, 在线加入 Sc、In 内标, 以标准曲线法测定待测样品溶液中铜离子的浓度, 计算血清铜离子浓度, 结果见表 3, 以 DAS3.0 软件绘制的血清铜离子释放曲线见图 1。

3 讨论

笔者 ICP-MS 法测定家兔血清铜离子的方法, 优化微波消解条件, 并通过标准曲线、检出限、回收率、精密度对该方法进行了研究。结果表明, 本法操作简单, 快速, 灵敏, 线性范围宽。微波消解法是直接通过加热样品使其吸收能量, 在密闭的情况下通过加压使样品在高温高压环境下与酸有效的接触, 既加快反应速率, 同时使血液中的细胞在内的有形成分充分溶解、破碎^[6]。微波消解法的铜加标实验回收率均 > 95%, 测定结果更加真实反映所测样品铜元素的含量。

笔者在本实验使用人用含铜 IUD 植入家兔子宫

表 3 血清中铜离子测定结果
Tab.3 Determination results of serum copper ion μg·L⁻¹

动物号	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d	42 d	56 d	70 d	84 d
1	308.4	282.6	526.0	456.2	380.3	431.7	352.1	432.9	694.5	515.5	852.5
2	310.2	327.0	491.3	482.0	447.6	521.0	494.6	523.5	704.0	585.5	618.5
3	379.5	461.9	408.9	482.0	447.2	306.9	288.7	481.1	352.8	411.3	518.5
4	331.7	392.3	419.1	803.0	605.5	792.5	615.0	580.5	532.0	519.5	456.0
5	348.9	339.0	481.8	495.4	389.4	502.5	524.5	560.5	676.5	697.0	724.5
6	316.7	457.2	546.0	419.3	410.3	331.7	371.2	482.7	596.0	504.5	369.3
7	344.3	422.3	499.8	511.0	345.2	369.3	397.0	451.6	558.0	400.6	517.5
8	377.5	435.0	575.5	339.1	342.9	332.7	294.7	417.5	490.2	421.8	242.4
均值	339.6	389.6	493.5	498.5	421.0	448.5	417.2	491.3	575.5	507.0	537.4
标准差	28.2	66.4	57.8	134.6	84.6	160.4	116.4	59.0	119.8	100.2	194.0

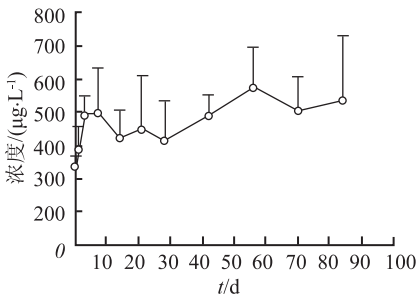


图 1 血清铜离子释放曲线

Fig.1 Release profile of serumal copper ion

体内,部分模拟人体带环后含铜 IUD 血清 Cu²⁺ 代谢的规律,通过系统评价和测定含铜 IUD 家兔子宫内放置不同时间后血清 Cu²⁺ 的变化,建立含铜 IUD 临床前血清 Cu²⁺ 代谢评价的方法,为今后国内外进行含铜 IUD 血清 Cu²⁺ 代谢研究提供技术指导和参考。实验结果提示家兔在子宫内放置该含铜 IUD 后 3 个月内,血清 Cu²⁺ 浓度维持在较低且恒定的范围,未出现“暴释”,提示其长期应用不会出现体内蓄积。不过临床 IUD 放置长达数年甚至数十年,所以下一步准备使用模拟

宫腔液测定更长时间含铜 IUD 的铜离子释放情况,以更好地为临床放置 IUD 后血清 Cu²⁺ 的代谢规律提供参考和借鉴。

参考文献

[1] CHI I C. What we have learned from recent IUD studies[J]. Contraception,1993,48(2):81.

[2] ORTIZ M E,CROXATTO H B. Copper-T intrauterine device and levonorgestrel intrauterine system: biological bases of their mechanism of action[J]. Contraception,2007,75(6):16-30.

[3] 张承典,徐乃欣. 用电化学方法研究 IUD 在人工配制液中铜的腐蚀[J]. 生殖与避孕,1995,15(1):28-32.

[4] 黄作明,黄殉. 微量元素与人体健康[J]. 微量元素与健康研究,2010,27(6):58-62.

[5] 王雪艳,苏丽丽,裴渭静,等. 电感耦合等离子体质谱法测定枸杞子中铜含量及不确定度分析[J]. 医药导报,2015,34(11):1513-1516.

[6] 刘伟,阎军,武刚. 密闭微波样品消解原理及常识[J]. 现代科学仪器,2000,3:51-54.

关于“黏”和“粘”的用法

黏:黏是指像糰糊或胶水等具有能使一个物体附在另一个物体上的性质,常作名词性词素。如黏土,黏性(黏性土),黏米,黏膜,黏液,黏稠,黏度(动力或运动黏度),黏滯,黏着(黏着力,黏着系数),发黏,黏附,黏合(黏合剂),黏结(黏结力),黏糊。

粘:粘是用黏的东西附在物体上或用黏的东西使物体连接起来,常作动词性词素。如粘连,粘贴,粘在一起,不粘锅。