

## 液液萃取-GFAAS 法测定生物样品中的 Cu( I )

张 源, 吴 鹏, 李 慧, 罗红军, 罗文鸿, 林哲绚\*

汕头大学医学院生物分析实验室, 广东 汕头 515041

**摘 要** 建立液液萃取-石墨炉原子吸收法测定生物样品中 Cu( I )方法。200  $\mu\text{L}$  血清及细胞匀浆、细胞膜液等样本与 200  $\mu\text{L}$  30%三氯乙酸混匀后,离心去蛋白,取上清液 400 与 1 500  $\mu\text{L}$  pH 为 12.5 的甘氨酸-NaOH-缓冲溶液混至 pH 约为 9,加入含 1 000  $\mu\text{L}$  0.05% 2,2'-联喹啉的正戊醇溶液,旋涡振荡 1 min,静置分层后取有机层 500  $\mu\text{L}$  置于 2 mL 特氟隆消化管,于 95  $^{\circ}\text{C}$  烘箱烘 6 h 挥发有机溶剂,冷却至室温后分别加入 200  $\mu\text{L}$  硝酸和双氧水,80  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化,室温加入 600  $\mu\text{L}$  1%硝酸后用石墨炉原子吸收法,测定的结果为 Cu( I )含量。另取 100  $\mu\text{L}$  血清(200  $\mu\text{L}$  细胞匀浆、细胞膜液)置于 2 mL 特氟隆消化管,于 80  $^{\circ}\text{C}$  烘箱烘 5 h 至样品干燥,冷却至室温后分别加入 200  $\mu\text{L}$  硝酸和双氧水,80  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化后,室温用 1%硝酸稀释成 1 000  $\mu\text{L}$ ,用石墨炉原子吸收法测定总铜含量。方法检测限: 0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,相对偏差 $\leq 5\%$ 。回收率: 95%~102%。用此法检测了一些无机样品和生物样品。测定的结果表明,宫颈癌患者血清 Cu( I )比正常人要高,总铜含量差别不大。一些无机样品如自来水、农夫山泉水、尿液含 Cu( II )离子不含 Cu( I )离子,而生物样品如肝细胞及肝细胞膜含有 Cu( I )离子不含 Cu( II )离子。本法可以在混有 Cu( II )离子的情况下测定 Cu( I )离子,且 10 倍 Cu( II )离子浓度存在下测定痕量 Cu( I )离子无干扰。

**关键词** 亚铜;石墨炉原子吸收法光谱;甘氨酸;2,2'-联喹啉

**中图分类号:** O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2020)02-0632-05

### 引 言

铜离子是生物体不可缺少的微量元素。铜离子参与生物体一些重要的生理过程,如细胞呼吸、神经递质的传递、抗氧化应激和铁离子的摄取<sup>[1]</sup>。人体许多疾病与体内铜离子失衡有关,如糖尿病、心血管病<sup>[1]</sup>、疯牛病<sup>[2]</sup>、AD 病<sup>[3]</sup>和癌症<sup>[4]</sup>等。神经退行性疾病由人体丧失铜蓝蛋白的生物活性造成<sup>[5]</sup>,有可能与 Cu( I )的毒性有关<sup>[6]</sup>。脑血栓病人血清小分子蛋白结合 Cu( II )含量发生变化,同样会降低血清铜蓝蛋白活性<sup>[7]</sup>。在生物体内,铜以 Cu( I )或 Cu( II )和酶、蛋白质分子以及一些生物小分子如氨基酸络合,通过两个形态之间的转换而得以进行生物化学反应<sup>[8]</sup>。当细胞内铜浓度过高时,Cu( I )和 Cu( II )之间的氧化还原反应能催化产生毒性的羟自由基,损伤脂肪、蛋白质、DNA 等生物大分子<sup>[9]</sup>。因此,测定生物体系中的 Cu( I )或 Cu( II ),可以定量了解生物体内铜离子价态的变化,对研究铜离子形态失衡有着重要的生理意义。

适宜 pH 条件下 Cu( II )与 1,10-菲罗啉反应形成的 Cu( II )配合物在光照条件下还原成 Cu( I )配合物,可用分光光度法测定试样中的 Cu( I )。在碱性条件下,1,10-菲罗啉与 Cu( I )形成的配合物在 428 nm 处有光吸收,用三乙醇胺和亚硫酸钠联合保护 Cu( I )不被氧化,可在混有 Cu( II )情况下直接测定 Cu( I )<sup>[10]</sup>。含有 Cu( I )和 Cu( II )离子的样品与 1.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 2-喹啉甲酸钠盐于 pH 8.7 混和后,用毛细管电泳将两者分离后由紫外检测器可分别测定两者的浓度<sup>[11]</sup>。在这些方法文献中,测定 Cu( I )时大多集中在无机样品中,且由于这些方法检测限高,灵敏度低,样品基体不复杂,通常不适合测定生物样品中的痕量 Cu( I )浓度。用石墨炉原子吸收法(GFAAS)测定铜检测限低,灵敏度高,目前只能定量测定总铜<sup>[12]</sup>,无法区分其中的 Cu( I )和 Cu( II )。

在血清中,铜蓝蛋白能结合血清中约 90% 的铜,铜蓝蛋白既可以通过铜转运蛋白 Ctr1 结合 Cu( I ),也可结合血清中多余的 Cu( II )以抑制脂质过氧化作用发生<sup>[13]</sup>。铜蓝蛋白主要通过其分子中的组氨酸残基上的氮与半胱氨酸残基上的硫与 Cu( I )和 Cu( II )结合<sup>[14]</sup>。在三氯乙酸的变性作用下,血

收稿日期: 2018-12-18, 修订日期: 2019-04-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671183), 广东省自然科学基金项目(2018A030307005)资助

作者简介: 张 源, 1962 年生, 汕头大学医学院生物分析实验室高级实验师 e-mail: yzhang1962@126.com

\* 通讯联系人 e-mail: g\_zxlin@stu.edu.cn

清中蛋白质中的铜可全部释放出来,碱性条件下,用盐酸羟胺将其中的 Cu(II)还原为 Cu(I),利用 Cu(I)和 BCA(2,2'-联喹啉-2,2'-二甲酸)钠盐反应生成紫色络合物,可用分光光度法测定血清或生物样品的总铜<sup>[16]</sup>。上述文献表明,血清中存在两种不同价态的铜,但迄今为止,没有相关文献报道血清中 Cu(I)的定量检测方法。

本研究利用碱性条件下甘氨酸螯合铜 Cu(II)溶于水不溶于有机溶剂<sup>[16]</sup>而亚铜试剂(2,2'-联喹啉)与 Cu(I)形成的络合物溶于有机溶剂而难溶于水的性质,通过 2,2'-联喹啉的有机溶剂处理含甘氨酸的水溶液生物样本将两种不同的形态铜分离在不同的水相和有机相中,从而可以用 GFAAS 法测定有机相中的 Cu(I)。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

AA-7000 型原子吸收光谱仪(岛津公司,日本)。铜空心阴极灯,波长 324.8 nm,工作电流 10 mA,狭缝宽 0.5 nm,氙灯扣背景技术,气流 0.2 L·min<sup>-1</sup>,进样体积 20  $\mu$ L,峰高定量进样。ASC-7000 自动进样器,涂层石墨管(日本岛津公司),美国 Millipore 公司超纯水器。Eppendorf 微量移液管。旋涡振荡器。离心机。所用玻璃和塑料器具用 10% HNO<sub>3</sub> 浸泡后用超纯水清洗三次。

CuCl 标准品(99.999%,阿拉丁);65% HNO<sub>3</sub>(德国默克优级纯);30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(德国默克优级纯);正戊醇(德国默克优级纯);1 g·L<sup>-1</sup>铜标准贮备液(国家钢铁材料测试中心)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准品的保存及标准溶液的配制

CuCl 标准品开封后,用 10 只 1 mL 塑料管分装,小心充入氩气,将管内空气驱净后用密封胶封好管口,并储存于放有硅胶的干燥器中。配制工作曲线时,取出其中一管,称取 CuCl 的标准品 0.015 6 g 置于 10 mL 容量瓶,用 0.05% 2,2'-联喹啉的正戊醇溶液稀释至刻度线,即 1 000 ppm 亚 Cu 标准溶液。取 100  $\mu$ L 用 2,2'-联喹啉的正戊醇溶液依次稀释成 10, 1, 0.1 和 0.01 ppm 溶液,取 0.01 ppm 溶液 1 000  $\mu$ L 置 2 mL 消化管于 95  $^{\circ}$ C 烘箱烘干(约 5 h),冷至室温后分别加入 200  $\mu$ L 65%硝酸和 200  $\mu$ L 30%双氧水密封,80  $^{\circ}$ C 水浴 1 h,冷至室温后加入 1 000  $\mu$ L 1% HNO<sub>3</sub>,上机时用 1% HNO<sub>3</sub> 作稀释剂,自动进样器自动稀释成 1, 2, 4, 8, 16  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> 做工作曲线。

#### 1.2.2 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液 pH 配制

处理不含蛋白的中性水溶液样本时,所用甘氨酸-NaOH 缓冲溶液 pH 用 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸和 0.5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 配至 pH 为 9。用 20%三氯乙酸处理含蛋白的样本时,由于三氯乙酸酸性较强,为了使上机前的样液 pH 大约为 9,所用甘氨酸-NaOH 缓冲溶液 pH 需要配到 12.5(按体积比 1:3 混合计算)。

#### 1.2.3 样本收集

宫颈癌血清由汕头大学医学院附属医院肿瘤医院检验室提供,健康人血清样本由汕头大学医学院第一附属医院体检

中心检验室提供,测定前储存于冰箱-80  $^{\circ}$ C。

细胞匀浆液及细胞膜液样本制备:人永生生化肝细胞 HL-7702 细胞在 DMEM/F12(1:1, V/V)含 10% NCS 培养三天后,去掉培养液,收集细胞,甘氨酸-NaOH 缓冲溶液(pH, 9.0)洗涤 3 次。于-80  $^{\circ}$ C 冰箱冻融三次破膜后,15 000 g×30 min 离心,上清为胞浆液,BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度。沉淀再经超声破碎,用 700  $\mu$ L 2% Triton X-100 溶解,得即细胞膜液,BCA 检测试剂盒检测蛋白浓度。

#### 1.2.4 总 Cu(TCu)含量测定

按文献<sup>[17]</sup>方法稍加改进:取 100  $\mu$ L 血清(200  $\mu$ L 细胞浆液或细胞膜液)置于 6 mL 特氟隆消化管,防尘措施下置烘箱 80  $^{\circ}$ C 敞口烘干(约 6 h),消解按 1.2.1 处理,用 1%硝酸稀释成 1 000  $\mu$ L,上机用 GFAAS 法测定总铜。

#### 1.2.5 Cu(I)含量测定

400  $\mu$ L 血清(细胞匀浆液、细胞膜液)与 400  $\mu$ L 20%三氯乙酸混匀,1 200 转离心 10 min 去蛋白,取离心后上清液 400  $\mu$ L 置 5 mL 塑料管内,加入 1 500  $\mu$ L pH 为 12.5 的甘氨酸-NaOH 缓冲溶液,混匀后加入 1 000  $\mu$ L 0.05% 2,2'-联喹啉的正戊醇溶液,旋涡振荡 1 min,静置分层后取有机层 500  $\mu$ L 于 6 mL 特氟隆消化管,95  $^{\circ}$ C 烘箱烘干(约 5 h),消解按 1.2.1 处理,室温加入 600  $\mu$ L,上机用 GFAAS 法测定 Cu(I)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 萃取条件的优化

#### 2.1.1 Cu(I)的络合试剂及其络合物的有机溶剂选择

血清中的蛋白经三氯乙酸沉淀,全部铜以两种不同形态的铜释放出来<sup>[15]</sup>。其中的 Cu(I)能与 2,2'-联喹啉结合且形成的配合物易溶于有机溶剂而难溶于水。选用 2,2'-联喹啉作为 Cu(I)的络合试剂。考虑正戊醇是一种微溶于水的无毒有机溶剂,与水混溶后迅速形成均匀的乳浊液,使得溶解在其中的 2,2'-联喹啉能充分结合水相中的 Cu(I)离子,形成的 Cu(I)配合物进入到正戊醇中。放置后正戊醇由于密度(0.81)比水小,很快浮在水面上层,水相与有机相液界面非常清晰,无须离心。因此,本文采用正戊醇作 Cu(I)试剂的有机溶剂。

#### 2.1.2 Cu(II)离子的配合剂选择及其浓度、pH 选择

如图 1 所示,用含 2,2'-联喹啉的正戊醇溶液与 10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> Cu(II)的纯水溶液充分荡时,有极少量 Cu(II)从水相转入有机相,对测定混存的痕量 Cu(I)时会产生干扰。产生这种原因,很可能因 Cu(II)离子与溶液中 OH<sup>-</sup> 或 Cl<sup>-</sup> 形成了低极性的配合物。要减少这种干扰,就必须降低 Cu(II)离子从水相转入有机相的量。

甘氨酸分子属于极性氨基酸,溶于极性溶剂,难溶于非极性溶剂。甘氨酸能与 Cu(II)形成稳定的无机络合剂,其稳定常数为 15.1<sup>[18]</sup>。因此选择甘氨酸作 Cu(II)离子的配合剂。

如图 1 所示,含 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 甘氨酸与 10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup> Cu(II)的水溶液与 2,2'-联喹啉的正戊醇溶液在不同 pH 条件

下充分振荡后,取有机相中检测其中的铜,  $\text{pH} \geq 8$  时几乎检测不到信号。分析认为,在较强的碱性条件下,甘氨酸与  $\text{Cu}(\text{II})$  离子发生类似的 Biuret 反应,  $\text{Cu}(\text{II})$  与 4 个  $-\text{NH}-$  键形成稳定的高配位螯合环结构<sup>[19]</sup>,在水溶液中具有非常稳定的结构,因而  $\text{Cu}(\text{II})$  离子很难进入到有机相。而在酸性条件下,甘氨酸存在形态主要为  $\text{NH}_3^+ \text{CH}_2 \text{COOH}$ <sup>[20]</sup>,大大降低了甘氨酸在水溶液中的极性,导致大量的  $\text{Cu}(\text{II})$  离子由水相进入到有机相。 $\text{pH} \geq 8$  的条件下,只要有足够的甘氨酸浓度,  $\text{Cu}(\text{II})$  离子几乎从不从水相被萃取到有机相。实验中取甘氨酸浓度为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

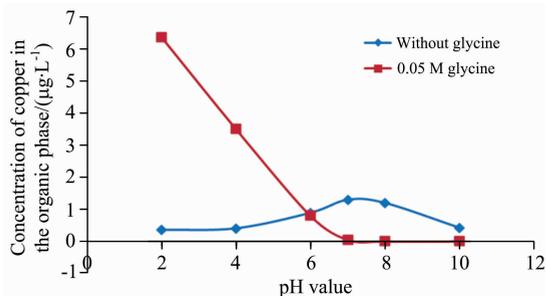


图 1 甘氨酸对  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{II})$  离子由水相进入到有机相的影响

Fig. 1 Effect of glycine on the entry of  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{II})$  ions from aqueous phase into organic phase

图 2 为混有  $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{I})$  与  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{II})$  两种离子的水相经过甘氨酸和 2,2'-联喹啉处理后,转移到有机相中的铜分析结果。从图 2 中可看出,在考察的 pH 范围内,  $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{I})$  绝大部分能从水相转移到有机相中。而  $\text{Cu}(\text{II})$  离子只有当缓冲溶液  $\text{pH} \geq 8$  时才不会进入到有机相,说明  $\text{pH} \geq 8$  时  $\text{Cu}(\text{II})$  离子对  $\text{Cu}(\text{I})$  离子的测定基本上没有干扰。

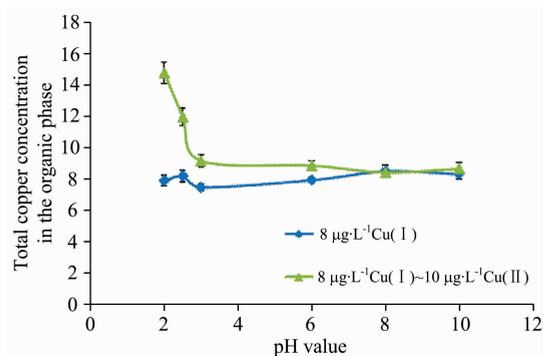


图 2 不同 pH 甘氨酸-NaOH 缓冲溶液对水相中不同价态铜离子进入到有机相的影响

Fig. 2 Effects of different pH glycine-NaOH buffer solutions with copper ions entering organic phase

## 2.2 $\text{Cu}(\text{I})$ 离子的稳定性

### 2.2.1 标准溶液中 $\text{Cu}(\text{I})$ 离子的稳定性

如图 3 所示,移取  $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}(\text{I})$  的氯化钾饱和溶液于 10 mL 塑料管内,盖紧管口,每隔 1 h 取出 1 mL 测定  $\text{Cu}$

(I) 浓度,结果表明,随着放置时间延长,  $\text{Cu}(\text{I})$  浓度会逐渐降低,7 h 后浓度几乎降低了一半。将  $\text{Cu}(\text{I})$  直接溶于 2,2'-联喹啉的有机相后,由于其与配合剂生成稳定的配合物,加上有机溶剂隔绝空气中的氧,7 h 内吸光度几乎没有什么变化。因此,短期内  $\text{Cu}(\text{I})$  标准溶液可用含 2,2'-联喹啉正戊醇溶液配置。

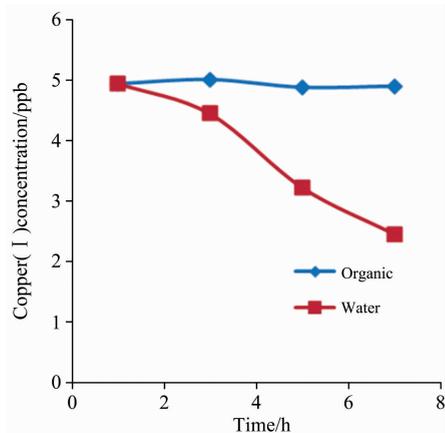


图 3 室温放置一天  $\text{Cu}(\text{I})$  在水相及有机相中的浓度变化  
Fig. 3 Concentration change of  $\text{Cu}(\text{I})$  in aqueous and organic phases at room temperature

### 2.2.2 生物样本处理过程中 $\text{Cu}(\text{I})$ 离子的稳定性

如图 4 所示,将血清样品分成两组,一组  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  低温冰箱保存,一组室温下放置。每隔一天测血清中的  $\text{Cu}(\text{I})$  浓度,一周后发现  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  低温冰箱的血清  $\text{Cu}(\text{I})$  浓度基本上没变化,室温下的血清  $\text{Cu}(\text{I})$  浓度降低了近 20%。这可能与保护  $\text{Cu}(\text{I})$  不被氧化的蛋白质降解有关,由于血清总铜不变,即部分  $\text{Cu}(\text{I})$  被氧化成了  $\text{Cu}(\text{II})$ 。因此,测定生物样品的  $\text{Cu}(\text{I})$  时,新鲜的血清应尽量及时处理,而对于浓度极低的细胞液或细胞膜液,则应在当天处理。

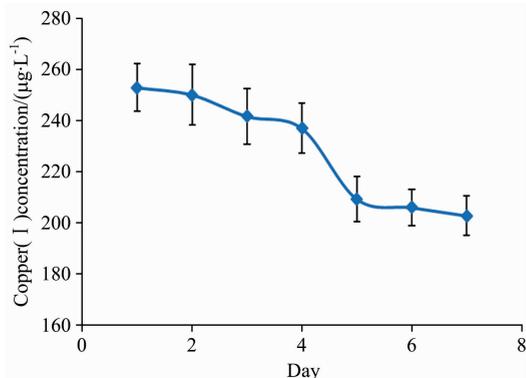


图 4 血清室温放置一周的  $\text{Cu}(\text{I})$  浓度变化  
Fig. 4 Changes of  $\text{Cu}(\text{I})$  cuprous concentration of serum at room temperature for week

### 2.3 最佳条件下考察 $\text{Cu}(\text{II})$ 对 $\text{Cu}(\text{I})$ 的干扰情况

图 5 为 pH 为 9 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲溶液条件下,10, 100 和  $1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Cu}(\text{II})$  离子从水相转移到有机相中,在有机相中测到的铜浓度值。结果表明,10 倍  $\text{Cu}(\text{II})$

离子浓度的存在,对 Cu(Ⅰ)离子的测定不再产生干扰。

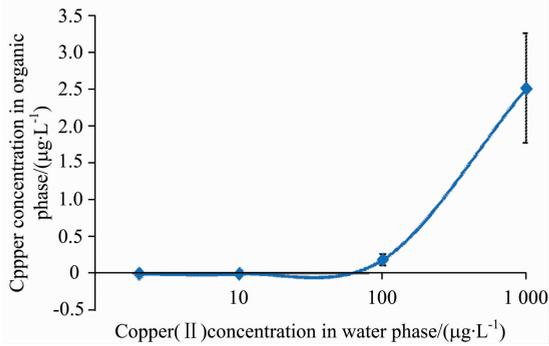


图 5 水相中不同浓度的二价铜进入有机相的浓度

Fig. 5 Concentration of copper ions in different concentrations in organic phase

2.4 方法的分析性能

按 1.2.1 方法制作测定铜标准系列,校准曲线方程为

$$A = 0.048c + 0.0005, R = 0.9995$$

按 3 倍空白标准偏差计算方法的检出限 ( $n=12$ ), Cu(Ⅰ)的检出限为  $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将一定质量 CuCl 的标准加入样品,按 1.2.5 方法处理后测定 Cu(Ⅰ),所得回收率和标准偏差见表 1。

表 1 方法回收率和标准偏差

Table 1 Recoveries and the relative standard deviation (RSD) of determination method ( $n=5$ )

原含量 / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	加标量 / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	加标后测定值 / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	加标回 收率/%	RSD/%	
				日间差	日内差
401	40	439	95.0	4.1	2.9
352	80	433	101	3.4	4.3
322	160	485	102	4.9	3.8

2.5 实际样品分析 ( $n=5$ )

表 2 说明,宫颈癌患者与健康者相比,血清总铜变化不大, Cu(Ⅰ)浓度明显偏高。

表 3 说明,农夫山泉水、自来水及尿液检测不到 Cu(Ⅰ),而细胞液和细胞膜中几乎没有 Cu(Ⅱ)离子存在。

表 2 健康者与宫颈癌患者血清中 Cu(Ⅰ)测定结果比较

Table 2 Comparison of serum Cu(Ⅰ) between healthy and cervical cancer patients

健康组	Cu(Ⅰ)/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	TCu/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	宫颈癌组	Cu(Ⅰ)/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	TCu/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
H1	$277.6 \pm 4.3$	$612.4 \pm 5.5$	C1	$363.6 \pm 3.7$	$723.2 \pm 8.8$
H2	$310 \pm 3.8$	$742.8 \pm 6.9$	C2	$381.6 \pm 4.4$	$799.6 \pm 5.3$
H3	$255.6 \pm 3.0$	$752.4 \pm 4.9$	C3	$405.2 \pm 4.8$	$872.2 \pm 7.5$
H4	$275.6 \pm 2.1$	$818.0 \pm 7.3$	C4	$396.4 \pm 2.5$	$650.8 \pm 7.2$

表 3 几种样品的亚铜和总铜含量

Table 3 Contents of cuprous and total copper in several kinds of samples

	农夫山泉水 / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	自来水 / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	尿液 / $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞匀浆液 / $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{Pro})$	细胞膜浆液 / $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{Pro})$
Cu(Ⅰ)	—	—	—	$34.5 \pm 1.6$	$25.5 \pm 0.7$
TCu	$0.261 \pm 0.15$	$13.6 \pm 0.9$	$38.5 \pm 1.0$	$34.9 \pm 1.2$	$25.0 \pm 0.8$

3 结 论

在 pH 为 8~10 的条件下,甘氨酸与 Cu(Ⅱ)形成溶于水不溶于有机溶剂的稳定配合物甘氨酸铜,2,2'-联喹啉亚铜溶于有机溶剂而不溶于水,利用此原理能将样品中同时存在的 Cu(Ⅰ)和 Cu(Ⅱ)分离在不同液相,进而用 GFAAS 法可以

测定血清中 Cu(Ⅰ)含量。本法可用于生物样品中 Cu(Ⅰ)离子的测定,10 倍的 Cu(Ⅱ)离子对其测定无干扰。目前定量测定生物体系中的铜仍然局限在总铜方面。本文报道  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级 Cu(Ⅰ)含量的检测,通过检测,可加深认识和了解生物体系中铜形态的转换及代谢失衡的变化规律,对研究老年痴呆、肿瘤、炎症等疾病状态下 Cu(Ⅰ)是否具有独自的病理生理意义有一定的意义。

References

[ 1 ] YU Yan, LI Hui-ling(于 燕,李惠玲). Journal of Environment and Health(环境与健康), 2018, 35(3): 272.  
 [ 2 ] Millhauser G. Annu. Rev. Phys. Chem., 2007, 58: 299.  
 [ 3 ] Squitti R, Barbati G, Rossi L. Neurology, 2006, 67: 76.  
 [ 4 ] Hussain S P, Raja K, Amstad P A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97: 12770.  
 [ 5 ] Hellman N E, Gitlin J D. Annu. Rev. Nutr., 2003, 22: 439.  
 [ 6 ] Shi X, Stoj C, Romeo A, et al. J. Biol. Chem., 2003, 278: 50309.  
 [ 7 ] Lai Minchao, Wang Dian, Lin Zhexuan, et al. J. Stroke Cerebrovasc Dis., 2016, 25(1): 214.

- [ 8 ] Fraústo da Silva J J R, Williams R J P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*. Oxford: Oxford University Press, USA, 2001. 600.
- [ 9 ] Haiiwei B, Gutteridge J M. *Moi. Asp. Med.*, 1995, 8; 89.
- [10] YANG Jing, LI Jian-qiang, LI Ren-yong(杨 竟, 李建强, 李仁勇). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2007, 35(9): 1393.
- [11] Basheer C, Lee H K. *Electrophoresis*, 2007, 28(19): 3520.
- [12] Zhang Yuan, Chen Yaowen, Lin Zhexuan, et al. *Clinical Laboratory*, 2014, 60(4): 543.
- [13] CAO Xiao-xiao, LI Yan-qin(曹晓晓, 李燕琴). *Foreign Medical Sciences • Section of Medgeography(国外医学医学 • 地理分册)*, 2011, 32(4): 277.
- [14] Subhra Samanta, Nicolai Lehnert. *Nature Chemistry*, 2016, 18(7): 639.
- [15] Brenner A J, Harris E D. *Analytical Biochemistry*, 1995, 226(1): 80.
- [16] LI De-guang, DU Xiang-ge(李德广, 杜湘革). *Journal of University Sciences(安徽农业科学)*, 2009, 37(5): 1897.
- [17] ZHANG Yuan, LIN Zhe-xuan, LI Hui, et al(张 源, 林哲绚, 李 慧, 等). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, 2004, 32(11): 1421.
- [18] CAI Jun-jun, ZHU Xiang-kun, TANG Su-han(蔡俊军, 朱祥坤, 唐素寒). *Journal of University Geology(高校地质学报)*, 2006, 12(3): 392.
- [19] Holme D J, Peck H. *Analytical Biochemistry*. 3 rd. New York: Addison Wesley Longman Limited, 1998. 388.
- [20] HU Wei-guo(胡卫国). *Shijiazhuang Journal of Chemical Industry(石家庄化工)*, 1997, (2): 33.

## Determination of Cuprous in Biological Samples by Liquid-Liquid Extraction-GFAAS

ZHANG Yuan, WU Peng, LI Hui, LUO Hong-jun, LUO Wen-hong, LIN Zhe-xuan\*

Laboratory of Biological Analysis of Shantou University Medical College, Shantou 515041, China

**Abstract** A method for the determination of cuprous [Cu(I)] in biological samples by liquid-liquid extraction-inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was developed. Serum and cell homogenate, cell membrane components were deproteinized with trichloroacetic acid, then the supernatant was mixed with a glycine-sodium hydroxide (NaOH) buffer (pH 12.5) to obtain a mixture with pH of 9. Then 1 000  $\mu\text{L}$  of 0.05% 2,2'-biquinoline dissolved in N-pentanol was added and vortexed for 1 min. After static layering, 500  $\mu\text{L}$  of the organic layer was collected in a 2 mL Teflon digestive tube, and the organic solvent was evaporated in an oven at 95  $^{\circ}\text{C}$ . After digestion with nitric acid and hydrogen peroxide, the sample solution was subjected to inductively coupled plasma mass spectrometry and the data of cuprous content were obtained. The detection limit of this method was 0.04  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , with relative deviation being less than 5%. The recovery was 95% to 102%. Then the method was applied to determine Cu(I) of serum from cervical cancer patients and several types of water. The results showed that serum Cu(I) was higher in cervical cancer patients than that in normal controls. Cuprous ions could not be detected in tap water, Nongfu Spring water, and urine. While, Cuprous ions but not divalent copper ions could be detected in cytosol and cell membrane. This method could detect trace Cu(I) ions in the presence of 10 times concentration of Cu(II) ion without interference.

**Keywords** Cuprous; Graphite furnace atomic absorption spectrometry; Glycine; 2,2'-biquinoline

(Received Dec. 18, 2018; accepted Apr. 29, 2019)

\* Corresponding author