

经验交流

尿液辜酮的准确测定

叶 尚 勉

(四川省计划生育研究所, 成都)

在放免测定中, 分离纯化样品中待测物质是保证测定准确性的一个重要步骤^[1]。生殖甾体激素常规放免测定方法, 一般采用乙醚或其它有机溶剂抽提分离样品中待测的甾体激素^[2]。但这种方法不能完全将甾体同样品中可与抗血清发生交叉反应的物质分离开, 往往得到过高的测定结果。本文介绍在尿液辜酮的放免测定中加用 Celite 柱层析纯化步骤, 获得较为准确的测定结果, 并和常规放免方法所得结果相比较。

实 验 方 法

收集了 190 份正常育龄妇女的和 22 份男童的尿液样品。因为妇女和儿童尿液辜酮含量很低, 本实验是先将尿液酸化水解, 然后测定其总的辜酮含量^[3]。常规放免测定法取 50 μ l 尿液 (加 150 μ l 磷酸缓冲液); Celite 柱层析取 200 μ l 尿液; 加 6M 硫酸 200 μ l, 37 $^{\circ}$ C 保温 24 小时。然后分别取 50 μ l ($\times 2$) 和 100 μ l ($\times 2$) 酸化水解的尿液加 10%NaHCO₃ 350 μ l 或 20%NaHCO₃

300 μ l 中和, 用 4ml 乙醚提抽。在分离和挥干乙醚后, 或直接用 0.2ml 磷酸缓冲液重溶, 按 ASO 介绍的放免方法测定其辜酮含量^[4]; 或用 1ml 的异辛烷重溶, 按 Brenner 介绍的方法作 Celite 柱层析^[5], 将收集到的洗脱物氮气吹干后, 亦用 0.2ml 磷酸缓冲液重溶, 按 Aso 的方法测定辜酮的含量。

在测定样品前, 一尿液池首先作辜酮的放射化学纯度试验^[6]。取 100 μ l ($\times 5$) 酸化水解的尿液, 经 20% NaHCO₃ 300 μ l 中和后, 加入 1500cpm/100 μ l 的 ³H-辜酮, 室温下平衡 15 分钟, 然后用 5ml ($\times 5$) 乙醚抽提, 并同时作 5 根 Celite 柱层析。按每段 0.5ml 收集洗脱物。将收自 5 根层析柱相同段的洗脱物分别合在一起。氮气吹干后用 0.5ml 缓冲液重溶。取 0.2ml 作放免测定; 取 0.2ml 直接测定 ³H-辜酮的放射性。

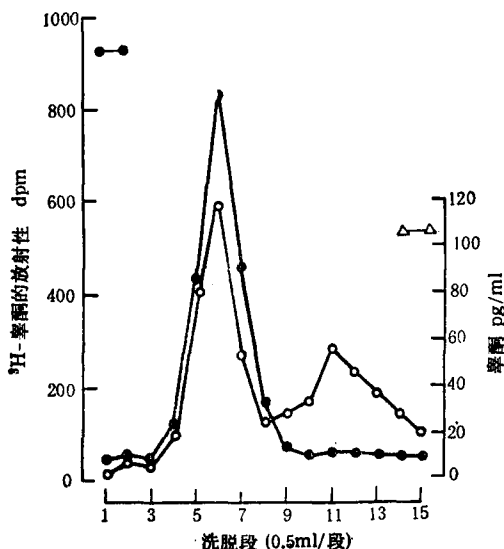


图 1 尿液辜酮放射化学纯度试验

●—● ³H-辜酮的放射性 ○—○ 辜酮 pg/ml

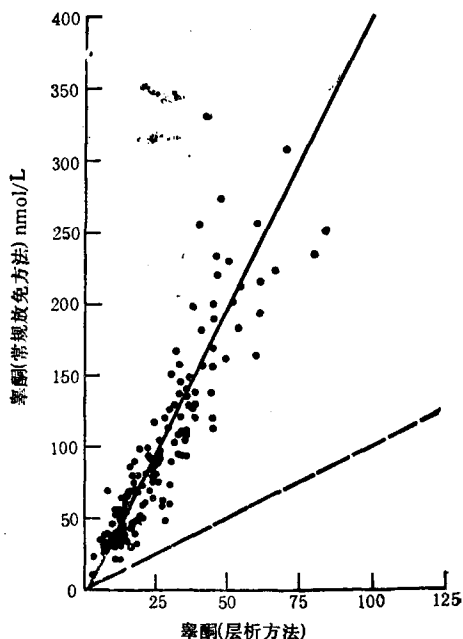


图 2 两种方法测定的尿液辜酮结果的比较

(正常育龄妇女样品), 虚线表示理论回归线 ($y = 1x$, $r = 1$), 横坐标的单位为 nmol/L

因此可测得每段洗脱物的辜酮含量和 ^3H -辜酮的放射性,从而计算出每段洗脱物的比放 (dpm/pg)。该试验重复三次。

结果和讨论

一、放射化学纯度试验

图 1 是尿液辜酮的放射化学纯度试验的结果。第 4—8 段各段 dpm/pg 的差异经方差分析无显著的统计学意义,其 F 值 $=0.9(df=4,15)$, $P>0.05$; 回归分析结果显示回归系数 (b) $=0.0075$, $P>0.05$, 无显著意义。说明采用 Celite 柱层析较完全地分离纯化了尿样品中的辜酮^[6]。第 4—8 段洗脱物测定的结果可作为参考标准。

二、尿液辜酮放免测定的精确度

辜酮层析方法测定的批内误差和批间误差 ($CV\%$) 分别为 8.90 和 12.16; 常规放免方法测定的批内误差为 8.18%, 批间误差为 7.68%; 均符合世界卫生组织操作手册的要求^[7]。

三、层析方法和常规放免方法所测结果的比较

图 2 显示两种方法规定的妇女尿样品辜酮含量的

比较。相关回归分析: $y=0.796\pm 3.80x$, $r=0.873$, 其斜率 ($b=3.80$) 与理论斜率 ($=1$) 相比有非常显著的差异 ($P<0.001$)。对男童尿样品, $y=44.04\pm 2.00x$, $r=0.961$ 。这些表明用常规放免方法测定尿液辜酮,其结果明显估计过高。但是,这两种方法所测定的结果密切相关,这表明常规放免方法,因操作简单在临床诊断和治疗上仍具有较高的实用性。

本实验在瑞典卡洛林斯卡医学院生殖内分泌实验室 Dr. Sz. Cekan 指导下完成,特此致谢。

参考文献

- [1] Cekan, SZ.: *Acta Universitatis Upsaliensis*, 1976, 14,
- [2] Suffi, SB. et al.: *WHO Method Manual: Programme for the provision of matched assay reagents for the radioimmunoassay of hormones in reproductive Physiology*, 1985.
- [3] Kjeld, JM. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1978, 86, 235.
- [4] Aso, T. et al.: *Clin. Endocrinol (oxf)*, 1975, 4, 173.
- [5] Brenner, PF. et al.: *Steroids*, 1975, 22, 775.
- [6] Cekan, SZ.: *Anal. Letters*, 1979, 12(B6), 589.
- [7] 肖碧莲等:《生殖与避孕》, 1984, 4, 51.

[本文于 1987 年 1 月 16 日收到]

会议简讯

第二届全国光生物学学术讨论会将于 1988 年 11 月在苏州召开

光生物学是研究光与生物之间的相互关系的科学,是农林、医药、环境、生物能源的基础学科。中国生物物理学会曾于 1984 年 12 月在柳州召开了第一届光生物学学术讨论会。征集了 70 余篇论文,交流范围涉及到光谱研究、光敏化作用、光医学、光合作用、受光生物的结构和形态的变化、生物发光、紫外光的分子和细胞效应、环境光生物学等内容,显示了我国光生物学研究的水平。是我国光生物学工作者的一次聚会。

中国生物物理学会光生物学专业委员会决定在 1988 年 11 月在苏州召开第二届全国光生物学学术讨论会,具体筹备工作由苏州大学负责。会议的主要内容是:生物光敏化作用、生物发光及超微弱发光、光医学、光合作用、光农业生物学、光对生物的影响及作用机理、光生物学研究技术等。现在开始征稿,凡准备参加会议,交流以上内容的科研工作,请写成 1000 字以内的论文摘要,缮写清楚,于 1988 年 6 月底前寄北京西外大街 141 号科学院植物所路荣昭同志收。会议具体事项待审稿录用后另行通知。

[中国生物物理学会光生物学专业委员会]