

经验交流

活化海绵镉微型柱层析法测定血清中一氧化氮

邓 健* 吕昌银 张建明 袁亚莉

(南华大学化学化工系, 衡阳 421001)

摘要 采用铜离子活化海绵镉微型柱层析法将血清中的硝酸盐(NO_3^-)还原为亚硝酸盐(NO_2^-), 再通过 Griess 反应测定 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 总量以反应体内一氧化氮(NO)水平, 从而建立血清 NO 间接测定新方法. 结果表明, 在 pH 9.7 时, 活化海绵镉还原 NO_3^- 能力强、速度快、抗干扰性好, 还原率为 96.4%~100.0%, 检测范围为 0~400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限为 1.85 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相对标准偏差为 2.56%~3.46%, 对 NO_3^- 的回收率为 96.4%~102.2%, 对 NO_2^- 的回收率为 95.2%~101.3%, 对混合标准液的回收率为 98.7%~104.4%. 该方法具有简便快速、灵敏准确、样品和试剂用量小等优点, 可在临床推广应用.

关键词 一氧化氮, 硝酸盐, 镉, 分光光度法, 生物化学检验

学科分类号 R446.1

一氧化氮(NO)作为新的神经递质和血管舒张因子, 近年来倍受医学界的重视. 由于 NO 在人体内含量低, 半衰期短, 很快被氧化为 NO_2^- , 继而转变为 NO_3^- (1 h 内将超过 95%), 因此测定 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 总量更能反映体内 NO 水平. 目前间接测定血清中 NO 的光度分析方法主要有金属镉还原法, 包括铜离子活化镉粒还原法^[1,2]和海绵状镉柱层析法^[3]两种. 前者由于镉颗粒大, 比表面小, 致使还原时间长, 还原效率低; 后者虽然镉的比表面大, 还原速度较快, 但存在抗干扰性能较差等缺点. 我们采用铜离子活化海绵状镉微型柱层析法将样品中 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 再用 Griess 试剂测定 NO_2^- 总量, 从而间接测定血清中 NO 含量. 该方法具有样品和试剂用量小、还原速度快、效率高、抗干扰性强、操作简便等优点, 适合于一般临床生化检验.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

723 型分光光度计 (上海第三分析仪器厂); 离心机 (上海手术器械厂). 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锌溶液; 55 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液; 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液 (pH 9.7); 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液 (用 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸-氢氧化钠缓冲液配制); Griess 试剂: 0.4% 对-氨基苯磺酸溶液

(用 20% 盐酸配制), 0.2% 盐酸萘乙二胺溶液; 标准液: 分别用双蒸水准确配制 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚硝酸钠、硝酸钠贮存液, 用时稀释成所需浓度; 混合标准液: 按 $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^- = 95:5$ 的比例配制成所需浓度.

1.2 实验方法

1.2.1 微型海绵状镉柱的制备: 在 50 ml 20% 硫酸镉溶液中投入足量锌皮, 反应 2~3 h, 然后用玻棒轻轻刮去锌皮表面的金属镉, 使镉沉底, 弃去锌皮及上清液. 用水多次洗涤后, 转入组织捣碎机中, 加适量水, 捣碎 20~30 s, 用水将金属细粒洗至标准筛上, 取 40~60 目之间的部分. 用水装满 1 支 0.5 cm × 15 cm 带磨砂漏斗底的微型层析柱, 在轻轻敲击下加入海绵状镉至 5 cm 高, 上面用一薄层玻璃棉覆盖. 镉柱装好后, 依次用 1 ml 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸、5 ml 蒸馏水洗涤, 最后用水封盖镉层待用.

1.2.2 血清去蛋白质: 取 100 μl 血清加 0.4 ml 75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸锌溶液、0.6 ml 55 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 充分混匀, 离心.

1.2.3 海绵镉活化: 取 1 ml 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液流经镉柱, 再用 3 ml 甘氨酸缓冲液冲洗镉柱.

* 通讯联系人.

Tel: 0734-8282835, E-mail: Dengjfp@263.net

收稿日期: 2000-05-29, 接受日期: 2000-07-27

1.2.4 NO₃⁻ 的还原: 取 400 μ l 去蛋白质上清液和 150 μ l 甘氨酸缓冲液混匀后, 流经镉柱还原, 用蒸馏水洗涤镉柱, 一并收集于刻度试管中, 定容至 2 ml, 得到镉还原样本液。

空白管及标准管分别用蒸馏水、标准液或混合标准液代替血清, 按 1.2.2~1.2.4 步骤操作, 分别得到镉还原空白液和镉还原标准液。

实验完毕, 用 1 ml 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸洗涤镉柱, 再用 5 ml 蒸馏水洗去酸液, 最后用水覆盖镉柱。经此法处理的镉柱可反复使用。

1.2.5 NO₂⁻ 总量测定: 分别在镉还原空白液、镉还原标准液及镉还原样本液试管中各加入 0.4 ml 0.4% 对-氨基苯磺酸, 混匀, 室温放置 5 min, 再在各试管中加入 0.2 ml 0.2% 盐酸萘乙二胺, 混匀, 室温放置 15 min, 用 1 cm 比色杯在 550 nm 处, 空白管调零, 测定吸光度。按公式: $c_{NO} (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = (A_{\text{样本}} / A_{\text{标准}}) \cdot c_{\text{标准}}$ 计算血清中 NO 的含量。

2 结果与讨论

2.1 吸收曲线

按实验方法用 723 型分光光度计进行光谱扫描测定, 结果表明, 标准和样品的吸收曲线十分吻合, 最大吸收波长为 550 nm。最大表观摩尔吸光系数 $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 1.71 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。本法选定 550 nm 为测定波长。

2.2 还原率测定

分别测定 6 个不同浓度的 NO₃⁻ 标准液, 按上述方法经镉柱还原后, 测定其还原率 (%) 为 96.4%~100.0%, 平均还原率为 97.57%, 而未经铜离子活化的镉柱还原率为 74.7%~91.7%, 平均还原率为 81.55%。

2.3 标准曲线与检测限

按实验方法测定系列不同浓度的标准混合液的吸光度, 将结果进行回归分析, 得吸光度 A 与 c_{NO} 之间的回归方程为: $A = 8.2 \times 10^{-4} + 9.6 \times 10^{-4} c$, 相关系数 $r = 0.9997$ 。以 3 倍空白值的标准偏差计算方法的检出限为 $1.85 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。NO₃⁻/NO₂⁻ 混合液浓度在 0~400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

2.4 pH 对活化镉柱还原作用的影响

在 pH < 8 时, 活化镉柱还原 NO₃⁻ 的能力较低, 随着 pH 值增大, 还原能力增强, 但当待测液 pH > 10.5 时, 其还原能力又迅速下降, pH 为 9.7

时, 还原作用最强。本法选用 pH 9.7 的甘氨酸缓冲体系。

2.5 干扰实验

测定了 0.25 mmol·L⁻¹ 维生素 C、5.0 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄、2.5 mmol·L⁻¹ Na₂B₄O₇ 溶液对两种镉柱法还原 NO₃⁻ 的抑制率并与铜包被镉粒法^[2] 进行比较, 结果见表 1。

Table 1 Comparison of restrained rate between three methods reducing nitrate

Method	% reducing nitrate		
	Na ₂ HPO ₄	Vit C	Na ₂ B ₄ O ₇
activated cadmium method	35.9	14.5	17.5
non-activated cadmium method	59.0	18.4	27.1
copper coated cadmium method	73.2	15.8	33.9

活化镉柱法抗 Na₂HPO₄、Na₂B₄O₇ 的干扰性比未活化镉柱法及铜包被镉粒法都有较大幅度的提高; 其他常见阴阳离子的存在不干扰测定; 蛋白质的存在抑制 NO₃⁻ 的还原, 按本方法对样品先进行去蛋白质处理, 可有效地排除蛋白质的干扰。

2.6 精密度试验

取混合血清样品分为两组, 一组平行测定 11 管, $\bar{x} \pm s = (60.90 \pm 1.56) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $CV = 2.56\%$; 另一组分管冰冻保管, 每日测定 3 管, 取平均值, 连续测定 10 d, 结果为 $\bar{x} \pm s = (61.58 \pm 2.13) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $CV = 3.46\%$ 。

2.7 回收率试验

分别将 NO₃⁻ 标准液、NO₂⁻ 标准液和 NO₃⁻/NO₂⁻ 混合标准液加入待测样品中, 测定回收率, 结果分别为: 96.4%~102.2%、95.2%~101.3%、98.7%~104.4%。

2.8 样品测定

按试验方法测定 89 例健康正常人、19 例肝硬化病人、22 例糖尿病病人及 41 例肺结核病人血清 NO 含量, 结果表明: 肝硬化组及糖尿病组血清 NO 水平分别为 $(139.3 \pm 70.8) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $(127.3 \pm 35.3) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 非常显著性高于正常组 $(79.2 \pm 19.6) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.001$), 与文献报道相符^[3,4]; 肺结核病人血清 NO 含量为 $(94.1 \pm 48.2) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亦明显增高 ($P < 0.05$), 对此将另行文探讨。

参 考 文 献

- 1 Cortas N K, Wakid N W. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem*, 1990, **36** (8): 1440~ 1443
- 2 茅惠明. 血清中硝酸盐的镀铜镉还原测定法. *临床检验杂志*, 1995, **13** (1): 6~ 8
Mao H M. *J Clin Lab Sci*, 1995, **13** (1): 6~ 8
- 3 袁亚莉, 邓 健, 何爱桃, 等. 微型镉柱还原分光光度法测定血清中一氧化氮. *分析试验室*, 1998, **17** (5): 54~ 56
Yuan Y L, Deng J, He A T, *et al.* *Analytical Laboratory*, 1998, **17** (5): 54~ 56
- 4 Guarner C, Soriano G, Tomas A, *et al.* Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*, 1993, **18** (5): 1139~ 1143

Determination of Nitric Oxide in Serum by Activated Spongy Cadmium on a Microscale Chromatographic Column

DENG Jian^{*}, LÜ Chang-Yin, ZHANG Jian-Ming, YUAN Ya-Li

(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

Abstract A new assay for indirectly detecting nitric oxide in serum was established. Nitrate was reduced to nitrite by activated spongy cadmium with copper ion on a microscale chromatographic column, then the nitrite was measured by the Griess reaction. The cadmium column has good vitality, high speed and low interference for the reducing reaction at pH 9.7. The reducing rates are 96.4% ~ 100.0%. The linear range of the assay is 0~ 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the limit is 1.85 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The RSDs are 2.56% ~ 3.46%, and the recoveries are 96.4% ~ 102.2%, 95.2% ~ 101.3% and 98.7% ~ 104.4% for NO_3^- , NO_2^- and $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (95:5) respectively. This method is easy, rapid and precise, needing only a small amount of sample and reagents, and can be used in clinical assay.

Key words nitric oxide, nitrate, cadmium, spectrophotometry, biochemical assay

^{*} Corresponding author. Tel: 86-734-8282835, E-mail: Dengjfp@263.net

Received: May 29, 2000 Accepted: July 27, 2000