

2,4-二硝基苯肼法联合测定血浆总抗坏血酸、 脱氢抗坏血酸及还原型抗坏血酸

朱迺硕 徐秋节 顾全珍*

(江苏省淮阴卫生学校)

提 要

为了同时测定总抗坏血酸中各组份,我们建立了 2,4-二硝基苯肼联合测定法。本法一次制备无蛋白血滤液,同时测定总抗坏血酸、脱氢抗坏血酸、还原型抗坏血酸,避免了以往使用几种方法而产生的系统误差,本法操作简便,且稳定,灵敏度高,准确性、重复性也较好。我们用本法对 40 例糖尿病人和 60 例正常人进行了测定,发现糖尿病人脱氢抗坏血酸明显升高,而正常人随年龄增长脱氢抗坏血酸与还原型抗坏血酸比值也升高。

血浆脱氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid, DHA)含量及其与还原型抗坏血酸(ascorbic acid, AA)比值测定目前日渐受到国外有关学者重视^[1,2],它较之只注意血浆总抗坏血酸(total ascorbic acid, TAA)含量具有更重要的病理意义和临床价值。早年有人报道,大剂量的 DHA 可以造成动物永久性糖尿病^[3]近年有人注意到糖尿病人血浆 DHA 明显升高。但由于抗坏血酸不稳定,测定方法又有多种,结果常偏离较大^[1,4]。

测定总抗坏血酸之各组分,通常一种方法只能测定一种成分,如 2,6-二氯吡啶酚法^[5]和 Folin 试剂法^[6]只能测定 AA,传统的 2,4 二硝基苯肼法^[7]只能用于 TAA 测定。为了同时测定总抗坏血酸的各组分,常要用到几种方法,这样不仅操作繁琐,且系统误差大;虽也有人在简化操作方面作过努力,但仍没有摆脱一些繁琐的步骤,作为实际应用甚为不便。我们经过二年多的工作,对多种方法进行了筛选,并建立了简便、稳定的 2,4 二硝基苯肼联合测定法,对 60 例正常人及 40 例糖尿病人血浆 TAA、DHA 及

AA 进行了测定和分析。

一、方 法

(一) 原理

同一份样品分为两管,一管用 Cu^{2+} 将还原型抗坏血酸氧化成脱氢抗坏血酸,然后与 2,4-二硝基苯肼作用生成红色的脎,颜色深浅与总抗坏血酸含量成正比。另一管以硫脲阻止还原型抗坏血酸氧化而显色脱氢抗坏血酸。两管之差为还原型抗坏血酸。

(二) 材料和试剂

仪器: 752 型光栅分光光度计,上海第三分析仪器厂产。

试剂: 1. 蛋白质沉淀剂: 含有 26.27mmol/L 硫脲的 0.45mol/L 偏磷酸(CP)溶液。2. 1 号显色剂: 含有 4.50mol/L 硫酸、41.89mmol/L 2,4-二硝基苯肼、1.60mmol/L 硫酸铜。3. 2 号显色剂: 含 4.50mol/L 硫酸、41.89mmol/L 2,4-二硝基苯肼、52.55mmol/L 硫脲。4. 15.67

* 淮阴市第二人民医院

mol/L 硫酸。5. 抗坏血酸标准溶液: 以倍比稀释的蛋白质沉淀剂准确配制含有 22.71 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸溶液。其余试剂均为分析纯。

(三) 操作步骤

被测者清晨空腹取静脉血, 肝素抗凝, 离心分离血浆, 取 1.8ml 血浆, 加入等量的蛋白质沉淀剂, 混匀, 3500 转/分离心 8~10 分钟, 取上清液, 按表 1 操作。

表 1 TAA、DHA、AA 测定步骤

加入物 (ml)	U ₁	U ₂	S	B ₁	B ₂
无蛋白血清液	1.0	1.0			
22.71 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸			1.0		
倍比稀释的沉淀剂				1.0	1.0
1 号显色剂	1.5		1.5	1.5	
2 号显色剂		1.5			1.5
混匀, 37℃ 保温 3.5hr.					
15.67mol/ LH_2SO_4 (冰浴滴加)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
混匀后放置 15 分钟, 以水调零, 分别测定 520nm 处吸光度得 A_{U_1} 、 A_{U_2} 、 A_S 、 A_{B_1} 、 A_{B_2} 。					

结果计算:

1. $\text{TAA}(\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{U_1} - A_{B_1}}{A_S - A_{B_1}} \times 45.42$

2. $\text{DHA}(\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{U_2} - A_{B_2}}{A_S - A_{B_1}} \times 45.42$

3. $\text{AA}(\mu\text{mol/L}) = \text{TAA} - \text{DHA}$

二、结果与讨论

(一) 标准曲线

准确配制浓度为 11.36 $\mu\text{mol/L}$ (2 $\mu\text{g/ml}$)及 22.71(4), 45.42(8)、67.13(12)、90.84(16)、113.55(20)、136.26(24) $\mu\text{mol/L}$ ($\mu\text{g/ml}$) 的标准抗坏血酸, 按表 1 操作, 绘出标准曲线。结果吸光度与浓度呈很好的线性关系。

(二) 蛋白质沉淀剂中硫脲的作用及浓度选择

在自然状态下, 溶液中抗坏血酸很易自发氧化, 以致测定难以准确进行, 为此我们在蛋白质沉淀剂中加入一定量的硫脲作为抗氧化剂。

1. 硫脲的抗氧化试验

配制含有不同浓度硫脲的蛋白质沉淀剂, 分别用以测定同一血浆样品中 TAA 及 DHA

含量, 以观察抗坏血酸的氧化程度(见表 2)。结果发现: ① 随着硫脲浓度的增加, 抗氧化能力逐渐增强, 抗坏血酸的氧化率逐渐降低, 最大抗氧化率达 41.9%。不加硫脲至少将有 40% 左右的 AA 自发氧化而被作为 DHA 测出, 且至少有 10% 的总抗坏血酸可能由于氧化分解从样品中消失而无法测出。② 不同浓度的硫脲使 TAA 的显色呈现一条峰形曲线, 显色最佳点的硫脲浓度为 26.27mmol/L, 此时, 硫脲的抗氧化能力也已接近最大值, 故选择含 26.27mmol/L 硫脲的蛋白质沉淀剂。至于峰形曲线产生的机制尚不完全清楚, 可能是硫脲抗氧化作用与促进成脲作用二者综合作用的结果。

表 2 硫脲的抗氧化试验

内容	沉淀剂中 硫脲浓度 mmol/L	0 (作为 自发 氧化 对照)	6.57	13.14	26.27	39.41	52.55
TAA 吸光度		0.109	0.096	0.110	0.121	0.100	0.073
DHA 吸光度		0.086	0.054	0.048	0.046	0.037	0.032
氧化态百分比 (DHA/TAA%)		78.9%	56.3%	43.6%	38.0%	37.0%	43.8%

2. 硫脲对脱氢抗坏血酸显色的影响

为了证明硫脲是否对 DHA 显色有影响, 我们作了如下实验: 按照 Joseph H, Roe 氏法^[8]制备浓度为 22.71 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA, 分别使用含不同浓度硫脲的蛋白质沉淀剂, 以 2 号显色剂显色, 发现不同浓度的硫脲对 DHA 显色无明显影响。见表 3。

(三) 2 号显色剂中硫脲浓度的选择

2 号显色剂用于 DHA 的显色, 它要求样品中 DHA 能够全部被测出, 而又保证在保温过程中 AA 不自发氧化而被作为 DHA 测出。我们配制了含有不同浓度硫脲的 2 号显色剂, 对血浆样品中 DHA 含量进行测定, 发现用不含硫脲的 2 号显色剂在显色保温过程中, 总抗坏血酸中至少有 23% AA 发生了氧化并被作为 DHA 测出, 当硫脲浓度达到 52.55mmol/L 时, 抗氧化作用已近最大值, 故选择含 52.55mmol/L

表3 硫脲对脱氢抗坏血酸显色的影响

沉淀剂中硫脲浓度 mmol/L	0	6.57	13.14	26.27	52.55	78.82	105.12
520nm 吸光度	0.116	0.116	0.118	0.118	0.116	0.116	0.116

表4 2号显色剂中硫脲浓度选择

2号显色剂硫脲浓度 (mmol/L)	0	13.14	26.27	39.41	52.55	65.69
DHA 测出值 ($\mu\text{mol/L}$)	18.17	10.22	9.65	9.08	8.52	8.52
氧化态百分比 (DHA/TAA%)	43%	24%	23%	21%	20%	20%

* TAA 为 $42.58\mu\text{mol/L}$

L 硫脲的 2 号显色剂。见表 4。

表5 氮气与硫脲抗氧化效果比较

标本号 内容 ($\mu\text{mol/L}$)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	$\bar{x}\pm SD$	显著性检验
TAA	23.28	26.12	35.77	45.56	45.56	57.91	82.33	123.20	161.81	200.42	80.62 ± 61.32	
DHA (充 N_2 抗氧化)	9.65	3.97	5.68	17.60	3.97	5.11	4.54	6.81	10.22	10.78	7.95 ± 4.54	$P>0.50$
DHA (硫脲抗氧化)	9.65	5.11	5.11	18.17	4.54	5.11	3.41	5.68	9.65	10.78	7.95 ± 4.54	

外,由于抗坏血酸是还原性物质,我们还作了还原型谷胱甘肽、半胱氨酸的干扰试验。以人血浆为试验样品,分别加入不同量的干扰物,然后测定其中 TAA、DHA 吸光度,同时设未加干扰物之对照管,结果发现上述还原性物质对测定结果有一定影响,随着还原性物质浓度增高,TAA 及 DHA 显色均有下降趋势,其中对 TAA 的影响较微,对 DAA 影响较明显,可能由于谷胱甘肽及半胱氨酸使 DHA 还原为 AA 而干扰显色的结果(见表 6)。

(五) 回收试验

为了验证本法测定的灵敏度,我们分别作了 TAA、DHA、AA 回收试验。

1. TAA 及 AA 回收试验

于同一血浆样品的 TAA 测定管和 DHA 测定管中加入 AA,结果在 TAA 测定管几乎全部被测出,而在 DHA 测定管中均未被测出,于是 AA 被作为 TAA 与 DHA 之差值几乎完全回收。说明此法灵敏度较高。见表 7。

前人为了准确测定 DHA 而在试管内充填氮气防止 AA 在保温过程中被氧化^[1]。此法操作繁琐。我们将硫脲的抗氧化效果与充氮气的效果作了比较,发现无明显差异(见表 5)。说明硫脲抗氧化效果是确切的,且操作较简便。

(四) 干扰试验

由于丙酮酸作为羰基化合物,在一定条件下也可以与 2,4-二硝基苯肼作用显色,我们进行了丙酮酸干扰试验,发现无明显干扰作用。此

2. DHA 回收试验

DHA 按照 Joseph H. Roe 氏法^[8]临用前制备。于各测定管中加入不同量的 DHA,并设对照。结果也几乎全部被回收。见表 7。

(六) 重复性试验

用同一份样品同时进行 20 次测定,其结果 TAA 为 $46.44\pm 0.28\mu\text{mol/L}$ ($\bar{x}\pm SD$), DHA 为 $13.51\pm 0.28\mu\text{mol/L}$, AA 为 $32.93\pm 0.40\mu\text{mol/L}$,批内 CV 分别为 0.6%、2.1%、1.2%。重复性良好。

(七) 临床应用

我们用该法对 60 例正常人及 40 例非胰岛素依赖型糖尿病人进行了测定,发现糖尿病人血浆 DHA 含量显著升高 ($P<0.001$),血浆总抗坏血酸中平均有 38% 是氧化型,而正常人只有 10% 是氧化型;DHA/AA 比值明显升高,约为正常人的 5.7 倍。

我们将正常人分为三个年龄组: 低龄组 (16—29 岁)、中龄组 (30—49 岁)、高龄组 (≥ 50

表 6 干 扰 试 验

干扰物名称	检测内容	520nm 吸光度值									
		未加干扰物	加入干扰物的量 ($\mu\text{mol/L}$)								
			45.45	90.90	181.78	325.4	650.8	976.2	825.4	1650.9	2476.3
丙酮酸	TAA	0.130	0.130	0.128	0.130						
	DHA	0.039	0.040	0.040	0.040						
谷胱甘肽 (还原型)	TAA	0.130				0.128	0.128	0.127			
	DHA	0.038				0.033	0.029	0.027			
半胱氨酸	TAA	0.129							0.126	0.127	0.124
	DHA	0.038							0.026	0.026	0.021

表 7 TAA、AA 及 DHA 回收试验

样 品	加 入 物	测定内容	各成份测出量 (μmol/L)					平均回收率
			未加入各成份 前测出值	各成分加入量 (μmol/L)				
				5.68	11.36	22.71	34.07	
人血浆	AA	TAA	28.96		40.31 (99.9%)*	52.46 (103.5%)	63.82 (102.3%)	101.9%
		DHA	5.51		5.51	5.51	5.51	0%
		AA	23.51		34.80 (99.4%)	46.95 (103.2%)	58.31 (102.1%)	101.6%
	DHA	DHA	5.45	11.36 (104.0%)	16.41 (96.5%)			100.3%

* 括号中数字为回收率。

表 8 正常人及糖尿病人血浆 TAA、AA、DHA 测定结果

情 况	例数	年 龄	性别 (男/女)	血糖* (mmol/L 空腹)	TAA ($\mu\text{mol/L}$)	AA ($\mu\text{mol/L}$)	DHA ($\mu\text{mol/L}$)	DHA TAA %	DHA AA
正 常 人	60	42.6 $\pm$ 19.9	30/30	4.55 $\pm$ 0.43**	27.88 $\pm$ 15.33	25.15 $\pm$ 14.48	2.67 $\pm$ 2.44	9.6	0.106
	20	21.8 $\pm$ 4.0	10/10	4.37 $\pm$ 0.28	32.31 $\pm$ 12.55	30.60 $\pm$ 11.58	1.31 $\pm$ 1.19	4.1	0.043
	20	39.3 $\pm$ 7.4	10/10	4.56 $\pm$ 0.45	34.12 $\pm$ 15.50	30.89 $\pm$ 14.08	3.69 $\pm$ 3.07	10.8	0.119
	20	66.6 $\pm$ 9.1	10/10	4.70 $\pm$ 0.49	17.03 $\pm$ 9.77	14.08 $\pm$ 11.81	3.01 $\pm$ 2.04	17.7	0.214
糖尿病人	40	49.6 $\pm$ 13.4	20/20	8.35 $\pm$ 2.68	32.76 $\pm$ 18.05	20.44 $\pm$ 16.47	12.32 $\pm$ 10.90	37.6	0.603

* 血糖以邻甲苯胺法测定；** 血糖、TAA、AA 及 DHA 栏中数据均为 $\bar{x} \pm \text{SD}$

岁)。结果发现高龄组血浆总抗坏血酸显著降低 ($P < 0.001$), 而高龄组及中龄组血浆脱氢抗坏血酸显著升高 ($P < 0.01$), 三个年龄组随年龄增加, DHA/AA 比值明显增加, 分别是 0.043、0.119、0.214, 呈正相关 ($r = 0.998, P < 0.05$)。见表 8。

我们的初步实验结果表明, DHA 含量及

其与 AA 的比值变化与某些病理过程及人体衰老有关。而以往认为 DHA 与 AA 具有相同的生理效应, 且在临床上只注意总抗坏血酸测定是不足的。

我们建立的 2, 4-二硝基苯肼联合测定法
(下转第 47 页)

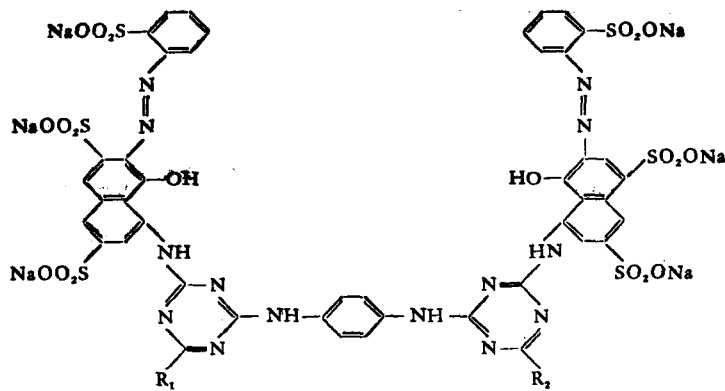


图4 Procion Red HE 3B 的结构

时则能顺利地将 L-PyK 从柱上解析下来。这一步的提纯倍数及回收率均超过一般的离子交换层析。染料亲和层析的作用机理尚不清楚,图4所示为 Procion Red HE3B 的结构,因染料主要对以核苷酸或脱氢辅酶(组成中有核苷酸)为底物的酶有亲和力。推测可能由于染料结构的某一部分类似于核苷酸所致^[1]。因活性染料有上述优点,故可推广应用于其它以核苷酸及脱氢辅酶为底物的酶的提纯。

参 考 文 献

[1] Dean, P. D. G.: *J. Chromatography*, 1979, 165, 301.

- [2] Kotlarz, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 484, 35.
- [3] Kirchberger, J. et al.: *Preparative Biochem*, 1982, 12, 29.
- [4] 徐伟军等:《生物化学与生物物理学报》,1986,18,410.
- [5] Marie, J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, 438, 393.
- [6] Harada, K. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 524, 327.
- [7] Laemmli, U. K. et al.: *Nature*, 1970, 227, 680.
- [8] Bradford, M. M. et al.: *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248.
- [9] 陈惠黎等:《生物化学与生物物理学报》,1980,12,263.

[本文于1986年12月29日收到]

(上接第51页)

为临床、营养学及药检部门提供了一个良好的抗坏血酸各组分分析方法。本法优点是一次制备无蛋白血滤液,同时测得 TAA、AA 及 DHA,且有利于抗坏血酸各组分比值分析,操作简便,重复性好。减少了以往用不同方法测定抗坏血酸不同组分,操作繁琐,系统误差大的缺点。

须指出,本法在测定 DHA 时,二酮古洛糖酸可同时被显色,但由于后者在血液中含量甚微^[1],实际应用中可以不予考虑。

南京医学院俞正荣副教授、宁丹谔讲师对此课题曾给予帮助,谨致谢。

参 考 文 献

- [1] Chatterjee, I. B. et al.: *Anal. Biochem.*, 1979, 98(2), 368.
- [2] Som, S. et al.: *Metabolism*, 1981, 30, 572.
- [3] Patterson, J. W.: *J. Biol. Chem.*, 1950, 183, 81.
- [4] Chatterjee, I. B. et al.: *Annals New York Academy of Sciences*, 1975, 258, 24.
- [5] 中山大学生物系生化微生物教研室:《生化技术导论》,人民教育出版社,1978,45页.
- [6] 司世麟:《生物化学与生物物理进展》,1984,6,80.
- [7] Donald, B. et al.: *Methods in Enzymology*, Vol. 62; Academic Press, New York 1979, P. 7.
- [8] Roe, J. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1948, 174, 201.

[本文于1987年3月2日收到]