

经验交流

应用二阶微商分光光度法测定血浆游离血红蛋白

康 建 陈胜洪 曹思连 初俊杰

(沈阳军区总医院, 沈阳)

用于血浆或组织中游离血红蛋白测定的常规方法, 主要包括血红蛋白 (Hb)-拟过氧化物酶法和分光光度法两类。但是, 经典的酶法^[1]其试剂稳定性和方法特异性均不甚满意, 且联苯胺或其衍生物又系类致癌物; 而分光光度法则常受血浆胆红素、脂血等因素影响。为此, 本文在 Sanderink 方法^[2]基础上, 结合现有条件, 采用计算机与分光光度计脱机方式, 建立了微商分光光度法, 使该法在减缓多种干扰所致误差的微量 Hb 测定中得以初步应用, 结果尚满意, 现报道如下。

材料与 方法

一、仪器 PYE Unicam SP8-100 型或国产 722 型分光光度计; IBM-5550 型微计算机。

二、计算机程序编制 基于微商光谱亦遵循兰伯-比耳定律, 按 $d^2A/d\lambda^2 = d^2\epsilon/d\lambda^2 \cdot c \cdot d'$ 式建立数学模型, 用 BASIC 语言编制专用程序。

式中 A = 吸光度; λ = 波长; ϵ = 消光系数 ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$); c = 摩尔浓度 (mol/L); d' = 光径 (cm)。

三、方法 分别取已知浓度 Hb 参考液及待测血浆样品各 0.30ml, 加等体积生理盐水, 混匀。置光度计以蒸馏水调零, 于波长 548—584nm (绘图 548—614 nm) 每间隔 6nm 记录吸光度 (A) 值。随后将其输入计算机, 报告血浆 Hb 浓度。

结果与 讨论

一、吸收峰及波长间距的选择 Hb 吸收光谱特征曲线示最大吸收峰在 412nm, 而 540nm 和 578nm 处为较小吸收峰。由于胆红素在波长 $438 \pm 8\text{nm}$ 处呈平坦吸收谱带干扰 Hb 412nm 和 540nm 吸收峰, 故选 578nm 吸收峰。本实验三种微商波长间距 ($\Delta\lambda$) 的回归分析见表 1。经结果比较截距以 $\Delta\lambda = 6\text{nm}$ 最接近于零。虽然斜率曾以 $\Delta\lambda = 4\text{nm}$ 为最佳回归系数 b , 但由于 $\Delta\lambda$ 较小以致 A 差值减小, 导致较大的随机误差和较低的信噪比。

二、本法特异性 1. 减免胆红素干扰作用: 在

表 1 不同波长间距的线性回归分析

$\Delta\lambda(\text{nm})$	斜率 (b)	截 距	相关系数平方 (r^2)
4	1.021	3.066	0.9964
6	1.114	-0.378	0.9969
10	1.127	-1.657	0.9923

注: X 轴示 Hb 浓度; Y 轴示本法实测浓度。

Hb 浓度为 80.21mg/dl 的血浆中分别加入胆红素 50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 及 150 $\mu\text{mol/L}$, 测得的吸收光谱和微商光谱见图 1。

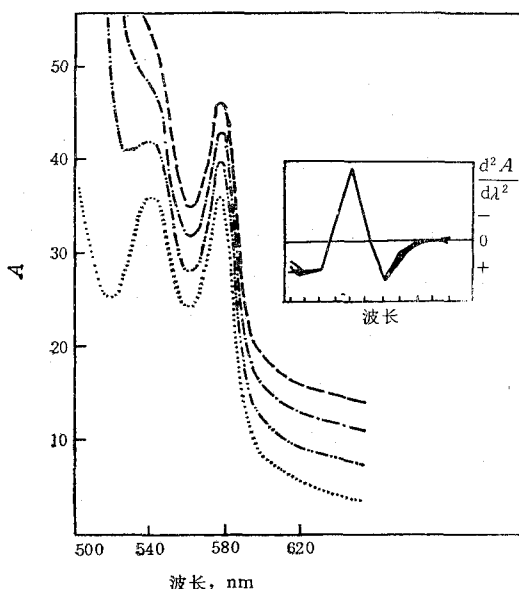


图 1 胆红素对血浆 Hb 影响之吸收光谱与微商光谱比较
虚线示 Hb 浓度为 80.21mg/dl 血浆样品的吸收光谱, 从上至下胆红素加入量分别为 150 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 及 0 $\mu\text{mol/L}$; 实线示相应吸收光谱的微商光谱。

由图 1 可见, 虽然吸收光谱 A 值随胆红素浓度增加而增高, 但由于其光谱斜率未变, 故所测得的微商光
(下转第 463 页)

稚造血细胞。

4. 白血细胞表现的主动反应和非线性电流-电压关系提示: 白血细胞膜上存在有电压依赖性电导 (Voltage-dependence conductance)^[15], 这种整流特性与 Gall 和 Miyazaki 报道的吞噬细胞^[8]和海星卵 (starfish oocyte)^[16,17] 的电流-电压曲线极为相似。对海星卵和吞噬细胞的研究发现, 其整流作用是与电压依赖性钾电导有关^[16]。相似的整流特性也曾在阿米巴的实验中发现^[18]。有人推测, 这些细胞内都富含收缩蛋白, 它们可能具有功能上的相似性。细胞内离子浓度的变化可能控制着与膜相关的活动。白血细胞的阿米巴样运动是否也受细胞膜对离子通透性变化过程的调控, 尚未见有文献报道。

同一患者中的不同肿瘤细胞对电流脉冲刺激表现出不同的电压反应(整流的和非整流的)是否意味着细胞分化程度和分化方向不同, 尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wilson, DB. et al.: *Rev. Biochem.*, 1978, 47, 933.
- [2] Nanberg, E. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 844, 42.
- [3] Tsien, RY. et al.: *Nature (Lond)*, 1982, 295, 68.
- [4] Cone, CD.: *J. Theor. Biol.*, 1971, 30, 151.
- [5] Binggeli, R.: *Cancer Res.*, 1980, 40, 1830.
- [6] 李万德等: 《第一届全国应用生理学术会议论文摘要汇编》, 西安, 1986, 73。
- [7] Howell-Fulton.: *Physiology and Biophysics*, Saunders, Philadelphia, 1982, 68—69.
- [8] Gallin, EK.: *J. Cell Biology*, 1980, 85, 160.
- [9] Araujo, EG.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, 856, 362.
- [10] Peltoranta, M. et al.: *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1983, 21, 731.
- [11] Stone, LC.: *J. Gen. Physiol.*, 1980, 76, 455.
- [12] Ferrier, J.: *J. Cell Physiology*, 1985, 122, 63.
- [13] Rosenthal, KS. et al.: *J. Cell Physiology*, 1983, 117, 39.
- [14] Shen, SS. et al.: *Cancer Res.*, 1978, 38, 1356.
- [15] Hall, JE. et al.: *Membrane Transport*, North-holland Biomedical Press, Elsevier, 1981, 107—112.
- [16] Miyazaki, SH. et al.: *J. Physiol.*, 1975, 240, 55.
- [17] Miyazaki, SH. et al.: *J. Physiol.*, 1975, 246, 37.
- [18] Tasaki, L. et al.: *J. Cell Comp. Physiol.*, 1964, 63, 365.

[本文于 1988 年 12 月 16 日收到]

(上接第479页)

谱相同, 依此求得的 Hb 含量显示不受胆红素干扰。2. 乳糜血浆: 乳糜所致浊度对 A 值的影响与波长有关, 即 A 值随波长减小而增加, 产生明显的基线漂移。本实验将 20mg、40mg 和 60mg Hb 参考液分别加至 Hb 含量为 1.22mg/dl 的稀释乳糜血浆内, 然后测绘微商光谱, 结果显示无基线漂移, 测得值分别为 22.56 mg、42.07mg 及 60.97mg/dl。

三、本法与酶法比较 30 份血浆样品经本法和改良酶法^[3]平行对照测定, 本法 $\bar{x} \pm SD$ 为 9.25 ± 8.95 , 酶法 $\bar{x} \pm SD$ 为 8.92 ± 6.96 , 回归方程

$$\hat{y} = 1.247x - 1.871, r = 0.970,$$

显著性检验 $t = 0.45$, $P > 0.05$ 。两法差相不显著。

四、线性与准确性 将 Hb 浓度为 10.31g/dl 参考液稀释成 6 种不同浓度, 平行测定三次, 测定浓度在 3—200mg/dl 范围内呈直线性。三种不同浓度 Hb 参考液加至 Hb 含量为 7.73mg/dl 的组合血浆内作回收试验, 结果回收率为 100.6—108.7%。

五、重现性 两种 Hb 浓度的组合血浆批内, 日间重复测定 10 次, 精密度见表 2。

二阶微商分光光度法是基于吸收光谱斜率变化而

表 2 本法精密度分析

项 目	Hb 水平($\bar{X}$)	n	SD	CV(%)
批 内	13.47	10	0.328	2.43
	35.75	10	0.498	1.39
日 间	13.41	10	0.543	4.05
	36.65	10	0.781	2.13

派生出的一种分光光度法, 本法有准确快速、减免浊度及特异性干扰等优点。测试中若用一标准滤光片或 Hb 参考液随测试样品同时校正每一波长 A 值, 则可减缓由手工调变波长产生的误差而获得更佳的重现性和准确性。

参 考 文 献

- [1] Crosby, W. H. et al.: *Blood*, 1956, 11, 380.
- [2] Sanderink, Ger-Jan, C. M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, 1985, 146, 65.
- [3] Tietz, N. W. et al.: *Fundamentals of Clinical Chemistry*, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1970, 269.

[本文于 1988 年 10 月 7 日收到]