

聚乙烯醇存在下结晶紫-杂多酸吸光光度法 直接测定血清无机磷

尤小梅 唐文恒

(安徽省巢湖卫校检验学科)

基于形成碱性染料-杂多酸原理测定磷含量已有报道^[1]。本文将该法用于血清无机磷测定,并用脲作为蛋白质稳定剂,在硫酸介质中,磷与钼酸根形成磷钼杂多酸,在聚乙烯醇存在下,磷钼杂多酸与碱性染料结晶紫缔合成离子对,其缔合物的最大吸收波长与显色剂本身的最大吸收波长有明显的转移,可直接测定血清无机磷含量。结果与公认的磷钼酸法一致。

材料与 方法

一、试剂

1. 磷标准贮存液: 1ml = 0.2mg 磷。
2. 结晶紫 (CV) 液 (E. Merck): 0.1% (W/V)。
3. 聚乙烯醇 (PVA) 液: 2% (W/V)。
4. 酸混合液: 钼酸铵 1.5g, 脲 1.5g, 无水硫酸钠 2.84g, 溶于 300ml 蒸馏水中, 缓慢加入浓硫酸 14ml, 冷却后加入 2% PVA 液 30ml, 加水至 500ml。
5. 磷显色剂: 酸混合液 25ml 与 CV 液 0.3ml 混合即可。临用前配制。

二、测定方法

1. 标准曲线制备: 将磷贮存液稀释成磷含量 (mmol/L) 为 0.6、1.0、1.2、1.8、2.4 五种浓度(含牛血清白蛋白为 6%), 按 Maria 法^[2]绘制标准曲线。
2. 测定步骤: 测定管加血清 0.05ml 及显色剂 5ml, 空白管加水 0.05ml 及显色剂 5ml, 混匀置 25℃ 水浴 5 分钟, 以空白管作参比液, 550nm 波长处比色, 读吸光度值查标准曲线得无机磷含量。

结果与 讨论

一、显色反应的最佳条件

PVA 存在下, 结晶紫-磷钼杂多酸缔合物 (CV-PMo) 光吸收曲线见图 1, 其吸光度与磷浓度在 0.6—2.4mmol/L 生理意义范围内呈线性关系。

分别以盐酸、硫酸、硝酸为介质进行实验, 以硫酸为介质时具有较灵敏和较稳定的显色反应。

CV-PMo 形成受酸度、钼酸根、脲及 PVA 浓度影响。当酸度低于 0.5mol/L, 蛋白质稳定性降低, 高于

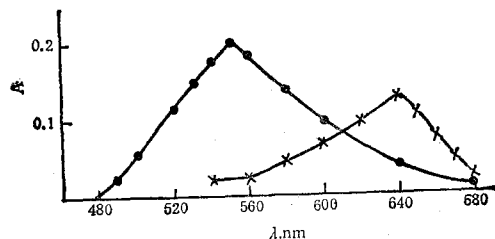


图 1 CV-PMo 缔合物吸收曲线

● CV-PMo (以空白试剂作参比)
× 空白试剂参比液(以水作参比)

0.5mol/L, 显色降低。为增加蛋白质在溶液中稳定性, 加入 3% 脲, 并发现脲对反应有增敏作用。MoO₄²⁻ 浓度过高引起蛋白质沉淀, 过低又影响杂多酸形成, 使吸光度降低。见图 2。

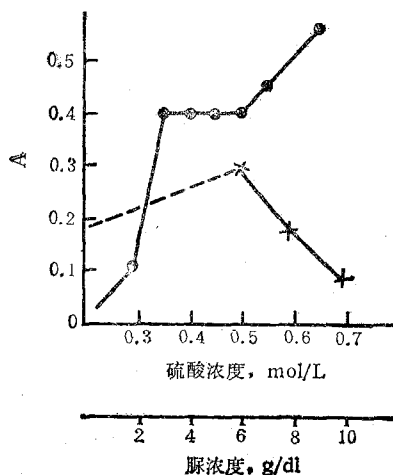


图 2 试剂用量对显色反应的影响

● 脲浓度 × 硫酸浓度(.....表示浑浊)

文献 [3] 表明, 各种非离子表面活性剂对碱性染料-磷钼杂多酸体系光度性质有影响, 以 PVA 为分散剂为宜, 其作用是缔合物的良好增溶剂。故试剂最适用量: 酸度 0.5mol/L、钼酸铵浓度 0.3%, 脲浓度 3%, PVA 浓度 0.12%, CV 浓度 0.0008%。

新型固定化乳酸脱氢酶研究

张 晓

王厚行

(重庆医学检验试剂研究所) (第三军医大学野战外科研究所, 重庆)

据现有文献资料,在我国临床分析化学领域内,所应用的固定化酶仅见过氧化氢酶、葡萄糖氧化酶、脲酶等很少几种。我们选用国产酶试剂和化学试剂,采取两种较温和的固定化方法,即白蛋白-戊二醛交联法和聚氯乙烯(PVC)包埋法,固定化乳酸脱氢酶(LDH)。前法在玻片上交联,取酶膜做试验;后法在玻棒上包埋,用酶棒做试验。两份相同的天然酶量经这两法固定后,用 MacQueen^[1] 改良法测酶活力发现: PVC 包埋法所保存的酶活力较白蛋白-戊二醛交联法所保存的酶活力高 30—40%。同时,把天然酶绝对量相同的 PVC 酶棒和原酶液进行比较,结果: 经 PVC 包埋法固定后的酶活力仍保持天然酶活力的 65%。

因而,我们选用 PVC 固定化 LDH 做稳定性和重复试验。同一根酶棒连续 20 次测定,其中每次酶棒保温完毕取出后,冲洗数次,再插入一支试验试管,间隔时间 2 分钟。所得结果 $\bar{x}=0.168$, $SD=0.0162$, 第一次与最后一次吸光度值分别为 0.168 和 0.159。在稳定性试验中,我们把酶棒分为三组: 分别于冰箱干燥保存,室温(20℃)保存和冰箱缓冲液保存,每日上午取出测定一次,连续一周。结果冰箱干燥组保存酶活力不变;室温保存组仍维持原制酶活力 50% 以上;而冰箱缓冲液组则下降至 50% 以下。Toftgard^[2] 曾

报道聚丙烯酰胺凝胶包埋 LDH 酶膜稳定期为 6 天,而本法稳定的最长时间仍在观察之中。另外,我们用改良 MacQueen 法测乳酸标准液,得出线性范围在 0—4.5mmol/L 内。若选用更高活性 LDH,可望获得更宽的线性范围。

用 PVC 固定化 LDH,未见国内、外报道。这种固定化 LDH 可以代替天然 LDH 用于丙酮酸或乳酸的测定;也可用于谷丙、谷草转氨酶的测定。鉴于我室已报道 PVC 固定化脲酶作酶电极测尿素^[3],这次 LDH 固定化成功,再次证明: PVC 作为临床分析用固定化酶载体,具有制作方法简便、易学,酶活力高而稳定,材料易得、价廉等优点。无论是酶电极、酶管、酶膜、酶棒等均可立即迅速制备。目前,我室已进行用 PVC 制备系列固定化酶的研究工作。

参 考 文 献

- [1] MacQueen J. et al.: *Am. J. Med. Tech.*, 1979, 45(1), 34.
- [2] Toftgard R. et al.: *Anal. Chim. Acta*, 1978, 99, 383.
- [3] 王厚行等:《生物化学与生物物理进展》,1988,15(3), 204.

[本文于 1988 年 5 月 16 日收到]

二、影响显色稳定因素

1. Na_2SO_4 作用: 在硫酸介质中加入 0.04mol/L 硫酸钠,可增加络合物的稳定性,其络合物的吸收峰未见变化。

2. 温度: 分别以 5℃、25℃、37℃ 保温 10—30 分钟观察对显色影响。反应控制在 25℃、5 分钟后比色,15 分钟内完成为宜。

三、方法学评价

重复试验: 同份血清重复测定,批内误差 0.93% ($n=20$),批间误差 4% ($n=15$)

回收试验: 于无机磷含量(mmol/L)为 0.9、1.0、1.5、2.0 四份血清中,每份分别加入 0.3、0.6mmol/L 磷,测定回收率范围为 95—105%,平均为 99%。

比较试验: 25 份血清以本法与磷钼酸法同时测定,回归方程 $\hat{y}=0.9181x+0.3004$, $r=0.9905$,呈高度相关。故本法正常参考值与磷钼酸法相同为

1.0—1.5mmol/L。

本法操作简单,不需除蛋白,也无须还原步骤,可直接测定血清中无机磷,不受血清中其它元素干扰,且单一试剂显色大大减少了操作中可能出现的误差,提高了方法的灵敏度。须注意,本法测定时应避免使用脂血、溶血标本。不同厂家、批号的聚乙烯醇对结果有影响。

本文承蒙本校高级讲师张必正帮助,谨致谢!

参 考 文 献

- [1] 袁孝良等:《理化检验化学分册》,1987,23(5), 263.
- [2] Maria. A. et al: *Clin. Chem.*, 1983, 29(2), 372.
- [3] 王怀公等:《分析化学》,1985,13(6), 430.

[本文于 1988 年 6 月 4 日收到]