

6 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983; 65: 55

7 Shacter E. Serum-free medium for growth factor-dependent and independent plasmacytomas and hybridomas. *J Immunol Methods*, 1987; 99: 259

8 Barnes D W, Sirbasku D A, Sato G H. Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells. New York: Alan R Liss Inc, 1984: 237

9 Tong H C, Zenon S, Hilary K. Production of monoclonal antibodies in serum-free medium. *J Immunol Methods*, 1980; 39: 369

10 Takazawa Y, Tokashiki M. High-density culture of mouse-human hybridoma in serum-free defined medium. *Biotech Bioeng*, 1988; 31: 168

11 Murakami H, Masui H, Gordon H S *et al*. Growth of hybridoma cells in serum-free medium: Ethanalamine is an essential component. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982; 79: 1158

12 Tharakan J P, Lucas A, Pao C C. Hybridoma growth and antibody secretion in serum-supplemented and low protein serum-free medium. *J Immunol Methods*, 1986; 94: 225

13 Schneider Y J. Optimisation of hybridoma cell growth and monoclonal antibody secretion in a chemically defined, serum and protein-free culture medium. *J Immunol Methods*, 1989; 116: 65

14 Honma Y, Kasukabe T, Okabe J *et al*: Replacement of serum by insulin, tranferrin, albumin, phosphatidyl choline, cholesterol, and some trace elements in cultures of mouse myeloid leukemia cells sensitive to inducers of differentiation. *Experimental Cell Research*, 1979; 124: 421

15 Mather J P, Sato G H. The use of hormone-supplemented serum-free medium in primary cultures. *Experimental Cell Research*, 1979; 124: 215

## 压电技术对不同红细胞压积血液粘弹性的研究\*

周铁安 聂利华 姚守拙

(湖南大学化学化工系,长沙 410082)

### 提 要

利用高频压电石英晶体的粘弹性、质量、应力多种传感功能,首次用于不同 Hct 人体抗凝血的研究.测量了石英晶体电极上微量血样干燥固化过程的谐振频率  $f_s$  和机械阻尼电阻  $R_q$ . 随干燥固化进行,  $f_s$  开始降低经极小值后突增转慢变化;  $R_q$  则很快增加达极值后迅降而趋稳定.  $f_s, R_q$  开始突变的时间、峰值大小均随 Hct 增而降. 初步探讨了压电响应与血液粘弹性及血块力学性能之间的关系和这种技术的应用潜力.

**关键词** 压电石英晶体,红细胞压积,粘弹性

压电石英晶体是一种性能优异的传感器,已成功地用于大气和溶液中微量化学成分的测定<sup>[1]</sup>、电化学<sup>[2]</sup>、免疫分析<sup>[3]</sup>、液晶相变研究<sup>[4]</sup>等领域.上述应用主要利用石英晶体对其表面敷层质量的高敏感性,故常称作石英晶体微天平(QCM).此外,尚发现石英晶体对敷层的粘弹性<sup>[5]</sup>和应力<sup>[6]</sup>及液体密度和粘度<sup>[7]</sup>等力学量有响应,但一般均作为质量敏感的不利因素而加以避免.本文采用在晶体电极上点滴微量人体抗凝血样的方法,考察了载有不同红细胞压

积(Hct)血样的石英晶体的谐振频率,与机械阻尼响应随时间的变化规律.探讨了压电响应与血液、血块粘弹性等特性之间的关系.初步结果表明这种技术灵敏、需血量极微,可望发展成为一种新型的血液力学性能测试手段.

## 1 材料和方法

### 1.1 血样的采取与分离

\* 国家自然科学基金资助课题.

收稿日期: 1991-10-12

修回日期: 1991-12-16

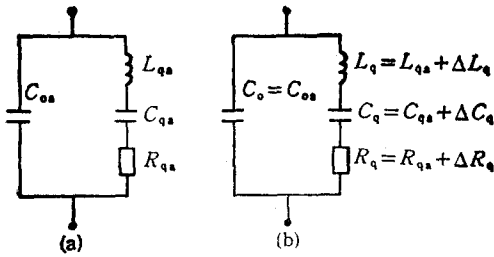


图1 压电振子等效电路  
(a) 无负载; (b) 有载

血样采自一健康男性青年的前静脉血。采用 3.8% 柠檬酸三钠以 1:9 (V:V) 抗凝。采血 5ml 于硅化离心管中, 以 1500 r/min 离心 15 min, 分离红细胞和血浆 (全血红细胞压积为 43.88%)。将浓缩红细胞和血浆以不同体积比混匀, 用于不同红细胞压积试验。实验用水为重蒸馏去离子水, 试剂为分析纯。

### 1.2 压电传感原理与测试方法

压电晶体本身为弹性体, 具有固定振动频率  $f_s$ , 当施加于被覆激励电极压电振子上的激励信号频率等于  $f_s$  时, 因逆压电效应产生机械谐振; 此时振子弹性性能最大, 并藉正压电效应输出振幅和电流达最大的电信号。在谐振频率附近, 无负载情况下, 压电振子可表示成图 1a 所

示的等效电路。电路参数与振子的物理特性相关。  $C_{0s}$  为静电容; 力学端参量动态电感  $L_{qa}$ , 动态电容  $C_{qa}$  分别与晶体的质量、柔度成正比, 动态电阻  $R_{qa}$  反映了晶体振荡时所受机械阻尼大小的影响。  $f_{s} = 1/2\pi\sqrt{L_{qa}C_{qa}}$  又叫串联谐振频率。当晶体表面承载一定机械负载时 (如在晶体电极上涂覆或滴加固、液涂层, 或将晶体浸入某种介质中), 其力学端参数将发生变化 (图 1b)。负载可能是完全无功的 (只改变振子等效柔度或质量), 完全有功的 (改变  $R_{qa}$ ), 以及综合的 (同时影响  $L_{qa}$ ,  $C_{qa}$  和  $R_{qa}$ ), 但最终均反映于晶体频率和阻尼的变化中。因而从测定由晶体和负载构成的复合振子压电参数 ( $f_s$ ,  $R_q$  等) 及其变化, 可了解振子表面敷层或周围介质的某些力学性能。如等效柔度的变化  $\Delta C_q$  与敷层的弹性或所受应力, 等效质量的变化  $\Delta L_q$  与敷层质量分别相关; 而敷层的粘滞性决定了  $\Delta R_q$  的大小。更复杂一点的情况是敷层力学性能随时间而变化, 这时可经压电参数的连续监测, 确定出负载粘性、弹性 (或柔性)、刚性及所受应力的动态变化规律。有关载血振子的压电响应规律和传感机理待后讨论。

本文所用压电晶体为 AT 切 9MHz 真空镀

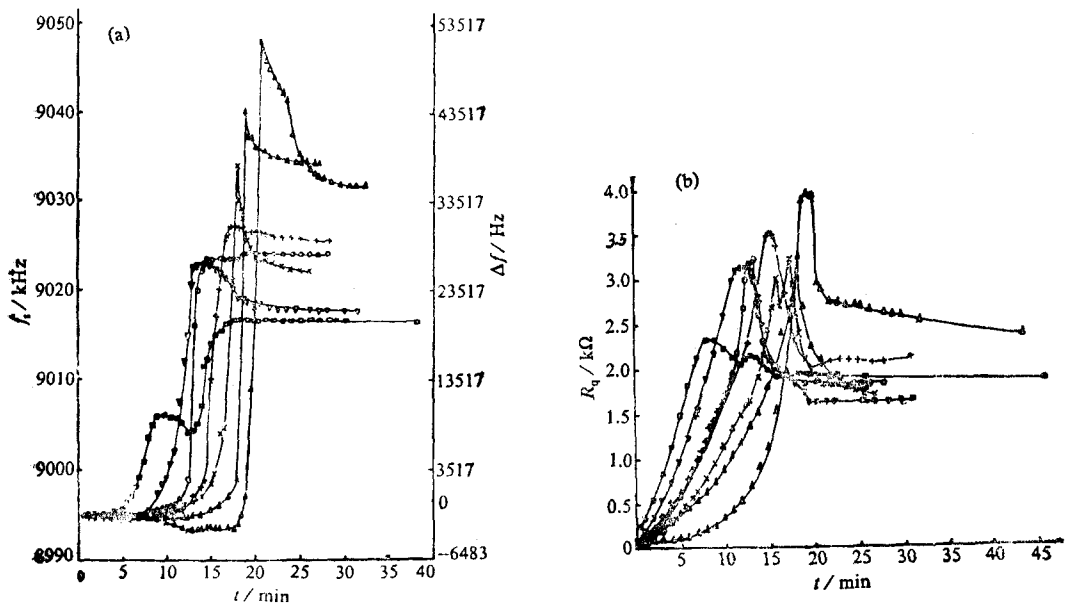


图2 不同 Het 抗凝血干固化过程的压电响应  
Hct (%): (□)100, (▽)70, (○)50, (+)43.88, (×)40, (▲)30, (△)0

银电极石英晶体(北京国营七〇七厂)。按文献 [8] 的方法用 HP4192A 阻抗分析仪测定放置于恒温控湿检测池内晶体的空载频率  $f_{sa}$  和动态电阻  $R_{qa}$ ，之后用 10 $\mu$ l 微量进样器(经硅化)滴加 1 $\mu$ l 血样于晶体电极中央，开始记时，测定不同时间的频率  $f_s$  和电阻  $R_q$ 。测试完毕，量出血块直径，并观察其形态。再依次以肥皂水、重蒸水和无水乙醇清洗、回复，开始下次测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 压电响应曲线

图 2 是在 37 $^{\circ}$ C，相对湿度 (R.H.) 为 75% 的测试环境下，所测得不同红细胞压积抗凝血干燥固化过程的压电响应曲线。其响应规律一般为：滴加血样后，晶体频率即下降 1—2kHz (其空载频率为 8996.483kHz)，之后随时间  $t$  增加， $f_s$  缓慢降低至最低值  $f_{min}$  后，以较快速度转而上升直到最高值  $f_{max}$ ，之后再次下降或减缓速度变化。而  $R_q$  则由空载时的 5 $\Omega$  很快增加至 2k $\Omega$  以上，直到最大值  $R_{max}$  之后又很快下降转慢变化。

### 2.2 血液和血块力学性能传感机理探讨

血样在晶体电极上，开始以液滴形式与电极接触，这期间的压电响应主要受血液粘滞性影响。之后随时间的增加，部分水分挥发，血样逐渐干燥固化。固化过程使血块弹性增大，同时血块收缩对电极产生压应力，并施以质量负载，而粘度衰减则大为降低。

随血液粘度增加，晶体机械阻尼增大，谐振频率下降。近似地，将血液看成牛顿型液体时(有关非牛顿型液体的简单实用的压电传感方程尚未建立)，相对空载时的频率变化和动态电阻增量与血液密度 ( $\rho_b$ )、粘度 ( $\eta_b$ ) 的关系可据我们前面的处理结果<sup>[9]</sup>求出：

$$\Delta f_{\rho, \eta} = f_s - f_{sa} = -f_{sa}^{3/2} (\rho_b \eta_b / \pi \rho_q \mu_q)^{1/2} A_b / A_e \quad (1)$$

$$\Delta R_q = R_q - R_{qa} \approx R_q = A_b (\pi f_{sa} \rho_b \eta_b)^{1/2} / K^2 \quad (2)$$

式中， $\rho_q$ 、 $\mu_q$  分别为石英的密度与弹性模量， $A_e$  为电极面积 ( $\phi_e = 6\text{mm}$ )， $K$  为机电耦合

系数， $A_b$  为血样与电极间的接触面积 (1 $\mu$ l 血样的最后血块直径  $\phi_b$  约为 2mm)，均为常数。随 Hct 增加，血液粘度增加<sup>[9]</sup>，因而同一时刻  $t$ ，频率降低值  $|\Delta f_{\rho, \eta}|$  应随 Hct 增而增(或  $f_s$  随 Hct 增而降)，但这种规律并不明显(图 2a)；而  $R_q$  随 Hct 增大明显增加(图 2b)。其原因为随 Hct 的增大，血液渐呈弹性，且弹性分量的增长率较粘性分量更大<sup>[9]</sup>。参照粘弹性液体负载对低频扭转式压电晶体的影响结果<sup>[10]</sup>，可推知血液弹性增加 (Hct 增大)，频率降低值减小，动态电阻增加。另一方面，随时间增加，水分的挥发，等效于 Hct 增大；因而频移开始向负的方向增加，后因血液弹性增加而趋稳定甚至往正的方向变化。水分挥发至一定程度后，血样便干燥固化。血液中含有蛋白质等高分子物质，因而可认为其固化与高聚物胶粘剂固化过程类似，伴随有内应力的产生<sup>[11]</sup>。随水分挥发，血块收缩，最后因流动性的失去，粘度剧增；产生张应力，对应晶体电极受压应力作用。且这种应力作用大小将与血块的弹性模量成正比<sup>[11]</sup>。对以厚度方向(沿  $x$  轴)剪切振动的 AT 切石英晶体，由其表面敷层应力作用所引起的相对频移为<sup>[6]</sup>：

$$\Delta f_s / f_{sa} = 2.75 \times 10^{-12} S_f / \tau_q \quad (3a)$$

$$S_f = \int_0^{\tau_q} T_f dx \quad (3b)$$

$S_f$  为敷层内每单位宽度所受的力， $\tau_q$ 、 $\tau_f$  分别为石英和包含应力作用敷层的厚度， $T_f$  为敷层所受的水平方向应力。敷层受拉伸，晶体受压缩时， $\Delta f_s > 0$ ，频率上升。同样，血样干燥固化时，将因与电极之间的摩擦作用而使动态电阻  $R_q$  增加，摩擦作用力的大小与电极受到的正压力，也即压应力成正比，故  $R_q$  亦将随  $|T_f|$  增加而增加。以血浆 (Hct = 0) 为例，随时间 ( $t$ ) 增加，水分挥发，粘度增加， $f_s$  下降、 $R_q$  增加，至 12min 左右， $f_s$  达最小值。之后固化开始，血块收缩产生应力、粘度再突增，频率因这两者的相反作用开始仅稍许增加， $R_q$  则加速上升；至约 18min，应力作用影响为主， $f_s$  很快突增而达极值； $R_q$  则因粘性衰减的减小先达极值后

很快下降。

对于晶体电极上固化的敷层，晶体频率还会因敷层质量(M)的增加而下降，若敷层为刚性，则相对频移可据 Sauerbrey 方程<sup>[12]</sup>计算：

$$\Delta f_M / f_{1s} = -M / \tau_q A_s \rho_q \quad (4)$$

因而在忽略血块粘度影响下，固化时有效刚性质量为  $M_b$  的血块由于应力(或弹性)和质量(或刚性)作用所引起的总的频率变化为：

$$\Delta f_m = f_{max} - f_{min} = \Delta f_s + \Delta f_M \\ = (2.75 \times 10^{-12} S_f - M_b / A_s \rho_q) f_s / \tau_q \quad (5)$$

上式表明，固化时频率上升值随血块弹性模量(影响  $T_f$  和  $S_f$ )的增加而增加，而随血块刚性质量  $M_b$  的增加而降低。随 Hct 增加，固体成分含量增加， $M_b$  增大；且血块弹性亦可能受红细胞变形性及其网络结构影响而随 Hct 的增加而降低。两者共同作用使频移峰高  $\Delta f_m$  随 Hct 之增加而降低。特别地，对浓缩红细胞(Hct = 100%)，呈现出两个峰形的复杂压电

响应。最后稳定频移值和电阻峰高一般亦随 Hct 的增加而降低。

### 2.3 干燥固化速度

随 Hct 的增加，血样水分含量减少，干燥固化所需时间缩短。图 3 的结果表明频率最低点 ( $f_{min}$ )，最高点 ( $f_{max}$ ) 相应时间  $t_1$ ,  $t_2$  及其差  $\Delta t$  随 Hct 增加均近乎线性减小。

本文结果表明，压电晶体对表面负载粘弹性、刚性质量、应力(或弹性)的多种传感功能可适用于不同 Hct 抗凝血液粘弹性及其血块力学性能的研究。我们还成功地用于血液凝固的监测和红细胞变形性的测定。这种技术的最大特点是灵敏、需血量极微、可动态监测，对液体和固体薄膜均敏感。因而在血液力学性能研究中的潜力值得进一步开发。但正因其对多种力学参数的敏感，使得从理论和技术上定量分离不同血液成分或功能对应的压电响应复杂化。

### 参 考 文 献

- 1 McCallum J J. *Analyst*, 1989; 114: 1173
- 2 Deakin M R, Buttry D A. *Anal Chem*, 1989; 61: 1147A
- 3 Ebersole R C, Ward M D. *J Am Chem Soc*, 1988; 110: 8623
- 4 Okahata Y, Ebato H. *Anal Chem*, 1989; 61: 2185
- 5 Mecea V, Bucur V. *Thin Solid Films*, 1979; 60: 73
- 6 EerNisse E P. In: Lu C et al. eds. *Applications of piezoelectric quartz crystal microbalances*, Amsterdam: Elsevier, 1984: 125—149
- 7 Kanazawa K K, Gordon J G. *Anal Chim Acta*, 1985; 177: 99
- 8 Zhou Tiean, Nie Lihua, Yao Shouzhao. *J Electroanal Chem*, 1990; 293: 1
- 9 Thurston G B. *Biophys J*, 1972; 12: 1205
- 10 Sakanishi A, Tanaka H. *Japanese J Appl Phys*, 1973; 12: 1410
- 11 Wu Souheng. *Polymer interface and adhesion*. New York: Marcel Dekker Inc, 1982: 465—473
- 12 Sauerbrey G Z. *Phys*, 1959; 155: 206

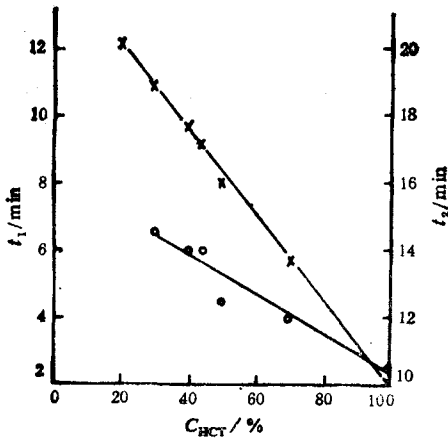


图 3 Hct 对抗凝血干燥固化速度的影响  
(○)  $t_1$ , (×)  $t_2$