1991 年已经明令淘汰;赖氏法中酶反应的丙酮酸量和酶活性之间不能呈现良好的线性关系,而且显色反应的工作曲线弯曲,不能满足酶活性测定要求。而丙酮酸氧化酶法中,ALT 催化 L-丙氨酸和 α -酮戊二酸生成丙酮酸和 L-谷氨酸,丙酮酸氧化酶催化丙酮酸氧化生成丙酸和 H_2O_2 ,过氧化物酶再催化 H_2O_2 、4-AAP 和 TBHBA 生成醌亚胺和水,此即为著名的 Trinder 反应。醌亚胺的最大吸收峰在 500 nm 左右,通过监测 500 nm 处吸光度可间接反映丙酮酸的生成量、反映 ALT 的活性。本方法具有较高的精密度,测定结果准确可靠,亦有很好的重复性,ALT 活性在 3~1 000 U/L 内有很好的线性,且标本用量少,可相对减少溶血、脂血的干扰,5 g/L 以内的血红蛋白对标本测定几乎不干扰,与速率法相比,主要性能指标相差无几。速率法采用酚试剂作为色原剂,在 H_2O_2 及过氧化物酶存在的情况下与 4-AAP 反应生成红色醌亚胺类化合物,此反应中的摩尔吸光系数为 6 000,由于 1 个 TBHBA 分子比酚多 1 个羧基和 3 个溴,用 TBHBA 代替酚反应,其摩尔吸光系数可达到 29 400^[4],因此大大提高了检测的准确性及精密度。丙酮酸氧化酶法是目前较为理想的 ALT 检测方法,其结果比较准确,线性范围宽,重复性好,而且反应生成肉眼可见的红色产物,用半自动光谱仪检测吸光度时可以避免漏检,采用检测效率高的可见光检测,大大降低了对仪器的要求,为便携式仪器的发展奠定了基础^[5-6]。但本法也存在影响因素,如血液中的还原性物质如胆红素、50 mg/L 以上的维生素 C、尿酸可与色原物质竞争 H_2O_2 ,从而消耗反应过程中产生的 H_2O_2 ,使测定

• 检验技术与方法 •

结果偏低^[7-8]。但综合分析,以 TBHBA 为色原测定 ALT 活性的方法操作简便、结果准确、影响因素少,对仪器设备的要求低,适合用于临床标本的测量,并可以提高检测的灵敏度。

参考文献

- [1] Moreno JM, Fágain CO. Activity and stability of native and modified alanine aminotransferase in cosolvent systems and denaturants[J]. J Mole Cata B; Enzy, 1997, 2(6): 271-279.
- [2] Trinder P, Webster D. Determination of HDL-cholesterol using 2, 4, 6-tribromo -3-hydroxybenzoic acid with a commercial CHOD-PAP reagent[J]. Ann Clin biochem, 1984, 21: 430-433.
- [3] 倪星忠. 临床生化酶试剂方法[M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1997: 127-128.
- [4] 王则宇, 姜斌, 班成超. 3 种丙酮酸氧化酶法试剂盒测定 ALT 比较[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(10): 96-97.
- [5] 信红霞, 杨光, 王成英, 等. 氧化酶法筛查献血者 ALT 的应用评价[J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(1): 50.
- [6] 李学仁. 丙酮酸氧化酶比色法测定血清 ALT[J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(3): 148.
- [7] 范加诚, 刘绪华, 陈秀丽. 丙酮酸氧化酶法在血清 ALT 活性测定中的应用评价[J]. 中国输血杂志, 2004, 17(1): 50-51.
- [8] 李平, 李耀峰. 生化检验目前存在问题及对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 748, 750.

(收稿日期: 2010-03-31)

干化学法检测钠离子的实验研究

吴杰红, 蒲晓允[△], 傅灵媛, 张志伦

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究基于干化学试剂和微型光谱仪技术快速检测钠离子的方法。方法 将所配制的电解质钠离子液体试剂采用干化学法制备,运用速率法的反应原理,测定 405 nm 处吸光度的变化,并对试剂的性能进行评价。结果 电解质钠离子液体试剂冻干后 90 d 内反应稳定性良好,其批内 CV<4%,批间 CV<5%,回收率为 95%~105%;当血清内胆红素(TB)含量小于或等于 290.40 μ mol/L、血红蛋白含量小于或等于 10 g/L,三酰甘油含量小于或等于 11.20 mmol/L 时,测定结果未见明显干扰;测定结果与全自动生化分析仪具有良好的相关性($r^2=0.9543$)。结论 以微型光谱仪干试剂法测定电解质钠离子结果准确可靠,检测过程简便,仪器试剂携带方便,符合战地救治、基层医疗的需要。

关键词:光谱分析; 电解质; 钠离子; 干试剂

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0377-02

电解质钠离子的测定是临床诊治和抢救的常规及急诊检测项目,也是军事医学中战地救治研究的重要内容之一。由于目前适用于野战环境的便携式急救生化仪器非常少,而且与全自动生化仪配套的电极价格昂贵^[1],因此本组研究了基于干化学试剂和微型光谱仪技术快速检测钠离子的方法,旨在研制适合野战、基层等小型医疗机构的便携式检测设备。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 微型光谱分析仪(重庆大学研制),波长 405 nm,吸光度线性范围 0.000~3.000; AU-2700 型全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司); ModulyoD-230 冷冻干燥机

(美国 Thermo 公司)。试剂 I: β -半乳糖苷酶 1.0 U/mL、Tris 缓冲液 400 mmol/L, pH9.0; 试剂 II: 硝基酚半乳糖苷 5.8 mmol/L、Tris 缓冲液 10.0 mmol/L, pH6.0。

1.2 方法

1.2.1 试剂的干燥及密封 取 1 套用于微型光谱仪的自制检测杯(光径 5 mm),底部预置搅拌子,按比例加入试剂 I,置于一 70 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,第 2 天加入试剂 II,继续预冻,待 2 种试剂结晶后,放入冷冻干燥机真空抽干 6 h,经过升华、解吸附,于 8.3 kPa 时取出,将干燥好的检测杯用塑胶加热密封,置于已放入硅胶的密封袋内保存。

[△] 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com。

1.2.2 检测 按比例稀释被测样品,取出干燥好的检测杯,吸取稀释后的样品 200 μ L 加入杯内,放入微型光谱仪,通过磁力搅拌均匀并对杯部加热,使其维持恒温 37 $^{\circ}$ C,孵育 60 s,在波长 405 nm 下进行检测,读取第 1 点吸光度值(A1),孵育 30 s 后读取第 2 点吸光度值(A2),共测 10 min。

1.3 方法评价

1.3.1 线性范围测定 配制浓度依次为 80、90、100、110、120、130、140、150、160、180、190 mmol/L 的钠离子标准液,确定线性范围。

1.3.2 精密度测定 取正常值质控品连续测定 10 次,进行批内重复性测定;取正常值质控品和自配高、低值浓度混合血清标本,分装冷冻,每天各取出 1 份进行浓度测定,连续 20 d,计算批内及批间变异系数(CV)。

1.3.3 回收率测定 取 0.9 mL 低值基础混合血清,分别加入 0.1 mL 含低、中、高浓度钠离子的标准液,测定回收率。

1.3.4 稳定性试验 试剂冻干取出后,分别于 1、15、30、60、90 d 进行起始 A 值和定值血清 A 值的测定,每次重复测定 10 次。

1.3.5 方法对比试验 收集临床测定钠离子浓度高、中、低值血清标本共 60 例,于 -20 $^{\circ}$ C 低温保存,分别用微型光谱仪和全自动生化分析仪同时进行检测。

1.3.6 干扰性试验 用患者混合血清进行测定,建立对照组和加入不同浓度可疑干扰物质(胆红素、血红蛋白和三酰甘油)的试验组,每组样品重复测定 3 次。

1.4 统计学处理 试验数据用百分率(%)及 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.0 统计学软件进行配对 *t* 检验和回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线性范围 测定钠离子在 80~190 mmol/L 内线性良好($Y=1.023\ 6X-2.844\ 5, r^2=0.997\ 2$),且能覆盖临床上的参考值和医学决定水平。

2.2 精密度测定 见表 1。

表 1 微型光谱仪批内、批间精密度检测结果

待检浓度 (mmol/L)	批内		批间	
	测定结果 (mmol/L)	CV(%)	测定结果 (mmol/L)	CV(%)
102	103.9 $\pm$ 0.23	2.64	100.8 $\pm$ 0.17	2.19
172	171.7 $\pm$ 0.36	3.98	173.4 $\pm$ 0.31	3.24

2.3 回收率测定 电解质钠离子低、中、高浓度标本的回收率分别为 99.40%、98.97%、100.16%,均在有效评价范围(95%~105%)内。

2.4 稳定性试验 钠离子检测试剂在 1、15、30、60、90 d 测定结果分别为(141.4 $\pm$ 1.5)、(140.9 $\pm$ 0.9)、(140.8 $\pm$ 1.2)、(141.0 $\pm$ 1.3)、(141.0 $\pm$ 1.3)mmol/L,未见明显偏差,说明该试剂在 90 d 内稳定性能良好。

2.5 方法学比较 微型光谱仪干试剂法与全自动生化分析仪电极法的检测结果相关性良好($Y=0.792\ 6X+32.997, r^2=0.954\ 3$)。

2.6 干扰性试验 当血清内胆红素浓度小于或等于 290.40 μ mol/L、血红蛋白浓度小于或等于 10.00 g/L、三酰甘油浓度小于或等于 11.20 mmol/L 时,未见明显干扰。

3 讨论

钠离子是急救中最常用的检测项目,也是战地救治必需的检测指标。目前,临床测定多运用电极法分析仪器,不适于野战环境及场地,不能满足战地及偏远基层地区医疗急救所需的机动、便携的要求^[2]。国内虽有小型的半自动生化分析仪,但其试剂不配套、针对性不强^[3]。本组在微型光谱分析仪基础上,选用了干化学法,结合自行研制的干化学试剂和自行设计的一次性使用检测杯(专利号 ZL200710078247.5, 2007-3-1),建立了 1 套以干化学试剂为基础,具有体积小、耗能少、光谱宽、重复性好等优点的电解质快速检测装置,具有较强的实用性,能够满足现代战争中机动性、隐蔽性需求。经过多次试验,逐步确定了试剂配制方法,并对其反应性能进行了调试,最终确立了本检测方法^[4]。本方法吸取了湿化学法中吸收光度法简便可靠的优点和干化学法中干化学试剂易于保存及检测的优点,将干化学试剂技术应用于微型光谱仪^[5-9]。由于本法的反应原理为酶促反应,反应温和,因此对仪器设备要求低,试剂、样品用量少,精密度高,批内及批间 CV 均在 5% 以内,回收率均在 95%~105%,且试剂稳定性较好,检测时间短,测定结果与全自动生化分析仪具有很好的相关性。由于整套装置微型简便,因此在军事医学中,该方法极具推广应用的价值。

参考文献

[1] 张海涛,王玉萍,郭晋. 酶法和离子选择电极法测定血清钾、钠的比较[J]. 检验医学, 2007, 32(2): 216-218.
 [2] 席云,肖刚,冉烈. 离子选择电极间接法与酶法测定血清钾、钠的比较[J]. 现代医学仪器与应用, 2004, 16(2): 5-6.
 [3] Suzuki H, Matsugi Y. Integrated microfluidic system for the simultaneous determination of ammonia, creatinine, and urea[J]. Sens Actu B: Chem, 2005, 108(22): 700-707.
 [4] Watts P, Haswell SJ. Microfluidic combinatorial chemistry[J]. Curr Opin Chem Biol, 2003, 7(3): 380-387.
 [5] 白晓,李强,吴杰红,等. 基于微型光谱仪干化学法检测电解质的实验研究[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33(10): 1265-1267.
 [6] 张春旭,王伟祥,高锋. 酶法、化学法与电极法测定血清电解质的方法学对比与评估[J]. 检验医学, 2004, 19(3): 256-257.
 [7] 陈麟凤,刘景汉. 常用细胞冻干保护剂的特性、作用机制及应用进展[J]. 中国输血杂志, 2006, 19(6): 500-502.
 [8] 李平,李耀峰. 生化检验目前存在问题及对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 748-750.

(收稿日期: 2010-03-31)