

· 论 著 ·

# 基于微型生化光谱分析仪测定血糖的干试剂研究

王华忠<sup>1</sup>, 蒲晓允<sup>2△</sup>, 吴杰红<sup>2</sup>, 李 强<sup>2</sup>

(1. 中国人民解放军第一六九中心医院检验科, 湖南衡阳 421002; 2. 第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

**摘要:**目的 探索一种制备葡萄糖干试剂的方法, 建立干试剂湿化学测定方法, 为干试剂微型生化光谱分析仪的应用奠定基础。方法 将测定试剂工作液添加到微孔板的小孔内, 每孔 200  $\mu\text{L}$ , 用冷冻干燥的方法将试剂干燥, 然后用水稀释测定样品, 温浴 10 min, 用酶标仪进行比色测定。对冻干添加剂的种类及浓度进行了筛选, 应用 TBHBA 替换酚试剂, 增强显色灵敏度, 将优化的方法与生化分析方法进行对比。结果 通过添加 10 g/L 清蛋白制备了复溶性和反应性都较好的葡萄糖干试剂, 以 TBHBA 替换酚试剂, 使灵敏度提高了 4.6 倍, 增加稀释倍数, 提高了反应速度, 增加了线性范围, 降低了检测限, 优化的方法测定结果与全自动生化分析仪结果具有较好的一致性。结论 通过对方法的改进和改良, 研制出了能有效测定血糖的干试剂, 为干试剂微型生化光谱分析仪的应用奠定了基础。

**关键词:**干试剂; 葡萄糖; 微量检测法; 微型生化光谱分析仪; 冷冻干燥; 微孔板

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1458-03

## An experimental research of a dry-reagent microassay for determination of glucose based on a miniature biochemistry analyzer

Wang Huazhong<sup>1</sup>, Pu Xiaoyun<sup>2</sup>, Wu Jiehong<sup>2</sup>, Li Qiang<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, 169 Hospital of PLA, Hengyang Hu'nan 421002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, 2nd Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** **Objective** To explore an effective way of preparation for dry glucose reagent and establish a dry-reagent microassay for determination of glucose based on a miniature biochemistry analyzer. **Methods** Add 200  $\mu\text{L}$  working solution of glucose reagent to each well of a microplate, and then dry the reagent by a lyophilizer. Serum samples or standards were diluted to redissolve the dry reagent and act in an incubation of 37  $^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes. The absorbance was determined on a microplate reader. Screen proper lyoprotector and its concentration to produce quality dry reagent. TBHBA was used as a new chromogen to replace the phenol reagent to improve the linear range and sensitivity. 30 clinical samples were analyzed with optimized method, and the results were compared with those of automatic biochemical analyzer to evaluate the correlation of two methods. **Results** Quality dry reagent of glucose was produced by adding 10 g/L albumin to working solution before lyophilization. The phenol reagent was replaced by TBHBA as chromogen and the sample/reagent ratio was adjusted to 1 : 200. This optimized method have the advantages of higher reaction velocity, higher sensitivity, wider linear range, and lower detection limit. There was a good correlation between the results and those of biochemical analyzer ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The improved method can meet the requirements for effective measurement of glucose with dry reagent, which paves the way for manufacture and application of a miniature biochemistry analyzer with a dry-reagent microassay.

**Key words:** dry reagent; glucose; microassay; miniature biochemistry analyzer; lyophilization; microplate

微型生化分析装置是生化分析仪发展的重要方向。近年来, 基于微型光谱仪的微型生化分析仪研究取得重大进展, 如重庆大学研制的微型生化光谱分析仪<sup>[1]</sup>。该类型分析仪体积小, 结构紧凑, 能在 380~780 nm 波长范围内分析各种化合物, 在进出口商检系统、临床医学、医药食品检测、环境监测、生化战剂侦测等领域中有着广泛的应用前景。本研究对葡萄糖干试剂的制备方法及方法学评价进行了探讨, 建立了干试剂湿化学测定方法, 为干试剂微型生化光谱分析仪的研制奠定了基础。现报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 仪器** F039300 型酶标仪 (TECAN, 奥地利), ModulyoD-230 型冷冻干燥机 (Thermo, 美国), AU-2700 型生化分析仪 (Olympus, 日本)。

**1.2 试剂** 保定长城的氧化酶法试剂盒 (GOD-POD 法), 自制色原 2,4,6-三溴-3-羟基苯甲酸 (TBHBA)<sup>[2]</sup>。清蛋白购自上海生工, 甘露醇购自北京鼎国, 葡萄糖购自重庆北碚化学试

剂厂。

### 1.3 方 法

**1.3.1 试剂冻干** 按说明书要求直接将酶试剂与酚试剂等量混合成工作液, 在 96 孔板上每孔加 200  $\mu\text{L}$  试剂 (只加 1 行, 即 12 孔), 将 96 孔板置于一 20  $^{\circ}\text{C}$  预冻过夜; 按说明书要求操作冷冻干燥机, 真空室气压约为 10 Pa, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱干燥 30 min, 除去残余水分后用保鲜膜密封备用。用 5 000 mg/L 葡萄糖标准液配制 1 000 mg/L 和 2 000 mg/L 标准液各 100  $\mu\text{L}$ , 按说明书要求的比例 (1 : 150) 加入水 1.5 mL, 充分混匀, 得到稀释液。在 1~4、5~8、9~12 孔分别加入 200  $\mu\text{L}$  的水、1 000 mg/L 稀释液和 2 000 mg/L 稀释液。观察试剂是否溶解和反应, 微量振荡器上振荡 10 s, 混匀后置 37  $^{\circ}\text{C}$  水箱, 继续观察 30 min。

**1.3.2 冻干添加剂的筛选** 在试剂中分别添加清蛋白和甘露醇, 添加的方式是将固体按一定质量体积浓度直接溶解于试剂中。取 2 块 96 孔板, 1 块每孔加添加清蛋白的试剂 200  $\mu\text{L}$ , 清

△ 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com.cn.

蛋白终浓度为 0、10、20、30、40、50 g/L; 另 1 块每孔加添加甘露醇的试剂 200  $\mu$ L, 甘露醇终浓度为 5、10、15、20、25、30、35、40 g/L。将 96 孔板置于 -20  $^{\circ}$ C 预冻过夜后冷冻干燥, 方法同 1.3.1。用 5 000 mg/L 葡萄糖标准液配制 250、500、1 000 mg/L 样品液, 以 1:150 的比例加入水, 得到稀释液。微孔内加入 200  $\mu$ L 稀释液, 做平行双测试, 同时设定空白孔。37  $^{\circ}$ C 水浴箱温育 96 孔板 10 min 后在酶标仪上比色测定, 终点法, 波长为 505 nm。

**1.3.3 清蛋白最佳添加浓度的确定** 取 1 块 96 孔板, 每孔加添加清蛋白的试剂 200  $\mu$ L, 清蛋白终浓度为 2、4、6、8、10、12、14 g/L。将 96 孔板置于 -20  $^{\circ}$ C 预冻过夜后冷冻干燥; 按 1.3.2 的方法分别测定空白, 250、500、1 000 mg/L 葡萄糖样品液, 双测试, 取平均值, 比较不同浓度清蛋白的效果。

**1.3.4 线性范围及灵敏度分析** 取 1 块 96 孔板, 每孔加添加 10 g/L 清蛋白的试剂 200  $\mu$ L; 将 96 孔板置于 -20  $^{\circ}$ C 预冻过夜后冷冻干燥; 测定 36 个空白孔, 从葡萄糖浓度为 200 mg/L 开始, 每次递增 200 mg/L, 直至 5 000 mg/L, 共测定 25 个样品, 双测试, 取平均值, 观察线性范围和灵敏度。

**1.3.5 以 TBHBA 为色原的测定** 在试剂盒的酶试剂中按 0.5% 加入 TBHBA, 不加酚试剂, 以此作为测定试剂。取 1 块 96 孔板, 每孔加添加 10 g/L 清蛋白的试剂 200  $\mu$ L; 将微孔板置于 -20  $^{\circ}$ C 预冻过夜后冷冻干燥; 测定 36 个空白, 从葡萄糖浓度为 200 mg/L 开始, 每次递增 200 mg/L, 直至 5 000 mg/L, 共测定 25 个样品, 双测试, 取平均值, 观察线性范围和灵敏度。

**1.3.6 比较不同色原及血清稀释度的效果** 方案 1 为测定试剂为混合单试剂, 样品与试剂的比例调整为 1:50, 冷冻干燥后测定 1~28 mmol/L 20 个样品浓度; 方案 2 为测定试剂为溶解 0.5% TBHBA 的酶试剂, 样品与试剂的比例调整为 1:200, 冷冻干燥后测定 1~28 mmol/L 20 个样品浓度; 比较两种方法的线性范围和灵敏度。

**1.3.7 测定方法的对比试验** 以溶解 0.5% TBHBA 的酶试剂作为工作试剂, 每孔加添加 10 g/L 清蛋白的试剂 200  $\mu$ L, 冷冻干燥; 取经生化分析仪测定的 30 份随机标本, 样品用水作 1:200 稀释, 每孔加 200  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 水浴箱温育 10 min 后在酶标仪上比色测定(都用 c-fas 标准定标); 将测定结果与生化分析仪的结果进行相关分析。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件进行数据统计学分析。

**2 结 果**

**2.1 试剂冻干** 直接冻干的试剂未从真空室取出时, 外观饱满, 颜色洁白。取出后, 小孔内的试剂迅速塌陷, 固缩成小块后贴在孔底, 颜色略黄。加水后, 试剂不能溶解; 加样品稀释液后, 试剂没有溶解, 无显色反应, 温育 30 min 后仍无溶解和显色反应。

**2.2 冻干添加剂的筛选**

**2.2.1 添加清蛋白的试剂冻干后的效果明显改善, 从真空室取出后仍保持固有体积, 外观洁白; 随着清蛋白添加量的加大, 冻干试剂逐渐出现淡黄色。冻干试剂加水后 5 s 内迅速溶解; 加入样品稀释液后, 很快出现显色反应。吸光度值见表 1。**

**2.2.2 添加甘露醇的效果总体不如清蛋白, 低浓度时冻干试剂仍出现类似无添加剂的皱缩、干结现象, 高浓度时呈现盐样结晶块, 可缓慢溶解, 但反应性差。具体吸光度值见表 2。**

**2.3 清蛋白最佳添加浓度的确定** 清蛋白浓度在 2~14 g/L

时, 冻干试剂颜色较浅; 清蛋白浓度在 2、4 g/L 时, 试剂出现轻度皱缩, 6 g/L 以上时, 可保持固有形状。具体吸光度值见表 3。

**表 1 不同浓度清蛋白冻干试剂测定不同浓度样品的吸光度值**

清蛋白(g/L)	不同浓度样品(mg/L)			
	0	250	500	1 000
10	0.001	0.031	0.048	0.130
20	0.002	0.018	0.049	0.107
30	0.004	0.029	0.046	0.098
40	0.005	0.022	0.036	0.084
50	0.005	0.026	0.045	0.087

**表 2 不同浓度甘露醇冻干试剂测定不同浓度样品的吸光度值**

甘露醇(g/L)	不同浓度样品(mg/L)			
	0	250	500	1 000
5	0.006	0.004	0.005	0.003
10	0.005	-0.003	0.002	0.007
15	0.000	0.001	0.001	0.002
20	0.001	0.000	0.001	0.002
25	0.002	0.002	0.001	0.004
30	0.001	0.003	0.002	0.004
35	0.001	0.002	0.002	0.006
40	0.002	0.003	0.002	0.006

**表 3 不同浓度清蛋白冻干试剂测定不同浓度样品的吸光度值**

清蛋白(g/L)	不同浓度样品(mg/L)			
	0	250	500	1 000
2	0.003	0.023	0.048	0.098
4	0.001	0.023	0.049	0.096
6	0.002	0.022	0.045	0.099
8	0.003	0.023	0.046	0.094
10	0.004	0.024	0.046	0.09
12	0.001	0.021	0.042	0.09
14	0.003	0.02	0.042	0.087

**2.4 线性范围及灵敏度的观察** 测定的标准曲线结果如图 1 所示。测定 36 个空白,  $\bar{x}=0.002, \sigma=0.006$ 。葡萄糖浓度在 3 800 mg/L 以内时, 线性良好, 总体  $r=0.99$ 。计算得到检测限为 89 mg/L。

**2.5 以 TBHBA 为色原的测定** 测定 20 个空白,  $\bar{x}=0.009, \sigma=0.010$ 。葡萄糖浓度在 4 800 mg/L 以内时, 线性良好, 总体  $r=0.99$ 。计算得到检测限为 243 mg/L。结果见图 2。

**2.6 比较不同色原及血清稀释度的效果** 方案 2 吸光度呈上升趋势, 直线斜率大于方案 1, 方案 2 显色强度更高。测定 20 个空白,  $\bar{x}=0.008, \sigma=0.006$ , 计算得到检测限为 0.7 mmol/L。见图 3。

2.7 不同测定方法的对比 将本法结果(Y)与 AU-2700 型生化分析仪结果(X)绘制成散点图,见图 4。直线回归方程为  $Y=0.992X-0.028, r=0.998, P<0.001$ 。

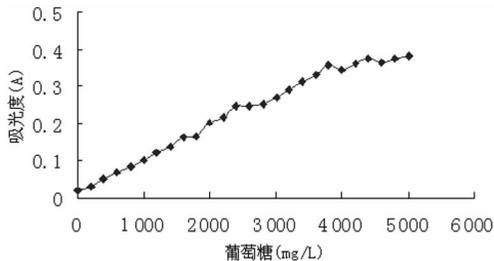


图 1 葡萄糖标准曲线(冻干试剂)

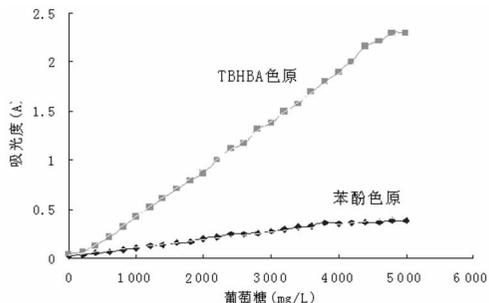


图 2 葡萄糖标准曲线(以 TBHBA 为色原)

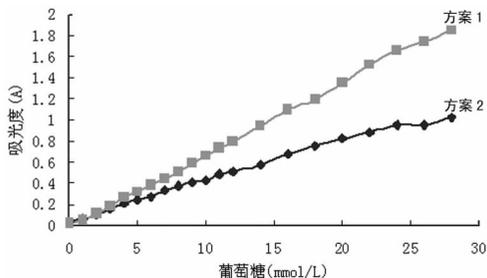


图 3 不同葡萄糖测定方式的比较

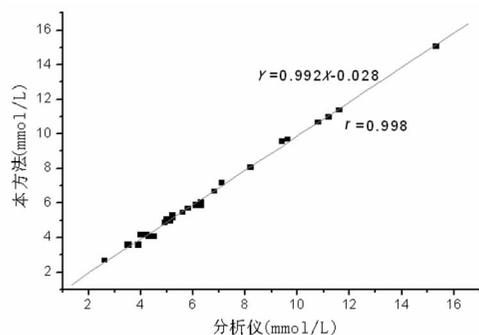


图 4 优化测定方法的对比

### 3 讨论

本研究采用 96 孔板干燥试剂,并在酶标仪上进行检测,一方面是由于微型生化光谱分析仪的改进研究尚未完成,分析仪测定效率非常低,需要样品和试剂量较大,难以满足本研究的要求;另一方面是由于酶标仪测定原理与微型生化光谱分析仪是一致的,但可实现高通量测定,所需样品和试剂量很小,国内外已有以酶标仪进行生化测定的研究报道<sup>[3-5]</sup>,表明该研究方法是完全可行的。本研究中每孔液体量加入量为 200  $\mu$ L,主要是为了保证测定的吸收光程在 6~7 mm,这与多数全自动

生化分析仪比色杯的光径是一致的,使测定结果与生化分析仪的结果具有更好的可比性。理想的干试剂生化板越薄越好,但太薄时会导致吸收光程太短,此时对测定灵敏度的要求就会过高,所以本研究选择生化分析仪比色杯的光径作为目标吸收光程,并将在后续研究中进一步改进。

靛亚胺在 505 nm 处有最大吸收,其吸光度与血清葡萄糖浓度成正比。酶试剂中有葡萄糖氧化酶、过氧化物酶、4-氨基安替比林、磷酸盐缓冲液,酚试剂为酚溶液。由于试剂中含有酶蛋白成分,所以在干燥方式上不能选择温箱干燥或烤干的方式,必须采用生物制剂生产中常用的冷冻干燥法。

冷冻干燥结果表明,不添加任何成分的直接冻干试剂不能正常溶解和反应。其原因可能是因为干试剂固缩、干结,其结构、性质发生了根本改变。所以在冷冻干燥过程中需要加入合适的辅料,辅料对制剂溶解性和生物活性的保持具有非常重要的作用<sup>[6]</sup>。常用的辅料主要有无机物(如氯化钠、磷酸盐等)、糖类(如甘露醇、葡萄糖、蔗糖等)、氨基酸蛋白质类(如甘氨酸、谷氨酸、清蛋白等),其中又以甘露醇和清蛋白的应用最为广泛<sup>[7-8]</sup>。

值得注意的是,清蛋白的添加浓度并不是越大越好。本研究显示,清蛋白浓度从 10 g/L 增加至 50 g/L 时,1 000 mg/L 样品液吸光度呈逐渐下降的趋势,说明清蛋白浓度过高将影响试剂的反应性,而且导致试剂外观呈淡黄色,空白吸光度增加,使检测限升高。比较而言,添加 10 g/L 清蛋白较为合适。为确定 10 g/L 是否是清蛋白的最佳添加浓度,本研究对 2~14 g/L 清蛋白浓度进行了筛选,证实清蛋白浓度在 6 g/L 以下时,没有达到应有的效果;6 g/L 以上时,基本上能保持固有形态,而且 6~14 g/L 范围内试剂反应性没有明显差别。因此选择 10 g/L 作为最适添加浓度,该浓度接近文献报道的添加浓度 1.25%<sup>[6]</sup>。数据显示,在 2~14 g/L 浓度范围内,清蛋白对反应性影响很小。因此,笔者认为 10 g/L 的清蛋白是既有效又足够的添加浓度。

原装试剂检测结果表明,血清葡萄糖在 3 800 mg/L(21.1 mmol/L)以内,线性关系良好,超过 3 800 mg/L 后结果偏低,与说明书中公布的线性范围上限 22 mmol/L 非常接近。不足之处是检测限不够低,高于氧化酶法理论检测限 10 mg/L。更重要的缺点在于总体吸光度偏低,正常参考值范围中的吸光度都在 0.1 以下,超出了吸收光度法要求的分析范围(0.15~1.0)<sup>[9]</sup>,存在产生较大检测误差的可能。所以有必要采取措施增强显色强度。Trinder 和 Webster<sup>[10]</sup>最先在测定高密度胆固醇时用自行合成的 TBHBA 替代苯酚作为色原,得到了可与参考方法相媲美的结果,而操作更为简便。由于 1 个 TBHBA 分子比苯酚多 1 个羧基和 3 个溴,用 TBHBA 代替酚,摩尔吸光系数可从 6 000 增加到 29 400,使灵敏度提高了 4.9 倍。笔者在此前的研究采用自行合成的 TBHBA 替代苯酚用于唾液葡萄糖检测,证实 TBHBA 可提高灵敏度 3.4 倍<sup>[11]</sup>。本研究显示,以 TBHBA 作为色原,其显色强度明显强于比苯酚,平均增强了 4.6 倍(见图 2)。其中也包括酶浓度增加的效应,因为原装试剂盒每个测试为酶试剂 100  $\mu$ L 加酚试剂 100 mL;TBHBA 作为色原直接溶解于酶试剂中,酶试剂用量为 200  $\mu$ L,因此以 TBHBA 替代苯酚作为色原时酶浓度提高了 1 倍。虽然酶本身并不直接参与显色反应,但可加快反应速度,相同条件下显色更强。TBHBA 不仅明显增强了显色,也扩大了检测范围,图 2 显示其线性范围可达 4 800 mg/L(26.7 mmol/L),高于原方法的 22 mmol/L。 (下转第 1465 页)

模后第 30 天大鼠 24 h 尿 8-OHdG 水平下降、尿蛋白水平增高,说明中性调宁蛋白可在 DM 早期抑制 DN 的过氧化损伤<sup>[11]</sup>。T2DM 模型大鼠肾脏 8-OHdG 表达高于非模型对照组 ( $P < 0.05$ ),并与 24 h UAER 密切相关,说明 DNA 的氧化损伤和 DN 密切相关;普罗布考治疗组肾脏 8-OHdG 的表达较非治疗组明显下降 ( $P < 0.05$ ),证实普罗布考可改善肾脏 DNA 损伤、减轻肾脏氧化应激损害<sup>[12]</sup>。本研究结果表明,T2DM 患者 24 h 尿 8-OHdG 水平高于健康者,临床 DN 患者高于无临床 DN 患者,与张霞等<sup>[13]</sup>的报道相符,证实尿 8-OHdG 水平检测可用于评价 T2DM 患者体内 DNA 氧化损伤及氧化应激状态。本研究亦发现 T2DM 患者 24 h 尿 8-OHdG 水平与 UAER 相平行,临床清蛋白尿患者 8-OHdG 水平最高,且 8-OHdG 和 HbA1c 也密切相关,均提示 T2DM 患者尿 8-OHdG 水平与 DN 之间的相关性肾脏局部氧化应激的增强联系密切,也证实了抗氧化治疗和强化血糖控制对防治微血管并发症的重要性。

总之,氧化应激在 DM 及其慢性并发症的发生和发展中起着非常重要的作用;ELISA 法检测尿 8-OHdG 水平可用于动态观察和评价 DN 患者体内的氧化应激状态。

### 参考文献

[1] Pan HZ, Chang D, Feng LG, et al. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications[J]. Biomed Environ Sci, 2007, 20(2):160-163.  
 [2] 高瑞霄, 姚朱华, 邵红霞. 尿 8-OHdG 与糖尿病性动脉粥样硬化相关性的研究进展[J]. 天津医药, 2009, 37(9):809-810.  
 [3] 周厚地, 刘东方. 8-OH 脱氧鸟苷与糖尿病[J]. 国际内分泌代谢杂

志, 2007, 27(6):392-394.

[4] 汪莉君, 邵华. 8-羟基脱氧鸟苷检测方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10):1915-1916.  
 [5] 郭翼华, 项嘉亮, 王小朝. 8-羟基脱氧鸟苷酸检测在预防糖尿病并发症发生的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(5):100-102.  
 [6] 杨艳. 不同糖代谢人群血清中 8-羟基脱氧鸟苷水平与胰岛素抵抗、胰岛  $\beta$  细胞功能的相关性研究[D]. 泰安:泰山医学院, 2009.  
 [7] 郭翼华, 项嘉亮, 黄碧云. 氧化应激与糖尿病并发症发生的相关性研究[J]. 中国基层医药, 2010, 17(17):2352-2353.  
 [8] 赖金玉, 谭忠伟, 黎彩鹏, 等. 妊娠合并糖尿病患者检测 8-羟基脱氧鸟苷酸的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(8):766-767.  
 [9] 徐敏, 杨红英. 氧化应激与糖尿病脑病[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(8):729-730.  
 [10] Josephine MF, Melina TC, Mark EC. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes[J]. Diabetes, 2008, 57(6):1446-1454.  
 [11] 谭荣韶, 刘岩, 陈辉, 等. 中性调宁蛋白对糖尿病早期肾间质炎症的抑制作用[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(2):142-147.  
 [12] 徐鑫, 刘东方, 周厚地, 等. 8-羟基脱氧鸟苷在 2 型糖尿病大鼠肾脏的表达及 Probuconol 的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(10):1358-1361.  
 [13] 张霞, 苏本利, 王赞峰. 尿 8-羟基脱氧鸟苷水平与糖尿病肾病的相关性[J]. 中国糖尿病杂志, 2006, 14(1):41-42.

(收稿日期:2011-03-11)

(上接第 1460 页)

为进一步加快反应速度,提高反应的稳定性和扩大检测范围,在以 TBHBA 作为色原的基础上,增加样品稀释倍数至 1:200(方案 2),并与原方法降低稀释倍数(方案 1)至 1:50 的结果进行比较,结果证实方案 2 的效果优于方案 1。方案 2 检测限为 0.7 mmol/L(126 mg/L),测定上限达 28 mmol/L,已能充分满足临床检测的需要。增加样品稀释倍数可以降低本底,降低检测限,加快反应速度,也使大部分血糖浓度正常或略高的标本吸光度值落在误差最小的范围内,达到了预期的效果。相较而言,单纯降低稀释倍数虽表面上增加了吸光度值,但反应体系中样品葡萄糖浓度/酶浓度比值增加,将降低反应速度,延长检测时间,从而违背了快速检验的根本目的。本研究对 30 份血清标本用优化的方法进行测定,与生化分析仪结果具有较好的一致性,表明该方法较为准确可靠,具有应用前景。

总之,本研究对可有效检测葡萄糖的干试剂进行了初步探索,建立了相应检测方法,为干试剂微型生化光谱分析仪的研制奠定了基础。

### 参考文献

[1] 陈刚, 温志渝, 温中泉, 等. 微型生化分析系统实验测试[J]. 光谱学与光谱分析, 2005, 25(3):439-443.  
 [2] Moshides JS. Enzymic determination of cholesterol fraction of high-density lipoprotein in plasma with use of 2,4,6-tribromo-3-hydroxybenzoic acid[J]. Clin Chem, 1988, 34(9):1799.

[3] Frenchik MD, McFaul SJ. A microplate assay for the determination of hemoglobin concentration[J]. Clinica Chimica Acta, 2004, 339(1):199.  
 [4] 吴斌, 崔云龙. 应用酶标生化仪微量测试血清葡萄糖的评价[J]. 医疗装备, 2002, 12(1):5-6.  
 [5] 刘录春, 遇婷. 丙氨酸氨基转移酶的微量检测法[J]. 预防医学情报杂志, 2005, 21(3):372-373.  
 [6] Izutsu K, Kojima S. Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying[J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54(12):1033-1039.  
 [7] Andrea H, Wolfgang F. Physico-chemical lyophilization behavior of mannitol, human serum albumin formulations[J]. Eur J Pharm Sci, 2006, 28(3):224-232.  
 [8] Ying H, Guo BQ, Xiu ZL, et al. Improved preservation of human red blood cells by lyophilization[J]. Cryobiology, 2005, 51(1):152-164.  
 [9] 应武林, 顾国耀. 分析化学[M]. 5 版. 青岛:中国海洋大学出版社, 2003:194-195.  
 [10] 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, 21:430-436.  
 [11] 刘琳琳, 王华忠, 蒲晓允. 以 TBHBA 为色原的唾液葡萄糖全自动分析法的建立及应用[J]. 重庆医学, 2006, 35(17):1552-1553.

(收稿日期:2011-07-21)