

全自动化分析仪测定血清铁

Automatic spectrophotometric method for determination of iron in serum

张成吉¹, 魏明至², 李儒平³

ZHANG Cheng-ji¹, WEI Ming-zhi², LI Ru-ping³

(1. 本溪市中心医院检验科, 辽宁 本溪 117000; 2. 沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024; 3. 沈阳市第六人民医院, 辽宁 沈阳 110005)

摘要: 以 2-(5-溴-2-吡啶偶氮)-5-[(*N,N*-二羧基甲基)氨基]苯酚(5-Br-PADCAP)作显色剂, 在 pH 6.5 HAc-NaAc 缓冲液中测定血清铁。

关键词: 铁; 血清; 自动分析法; 5-Br-PADCAP

中图分类号: O614.81; R446 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2003)01-0049-02

目前临床测定血清铁的方法主要有原子吸收法和使用有机络合剂显色的比色法, 原子吸收分光光度法^[1]为测定铁的参考方法, 但用血量较大, 且需专用昂贵仪器, 不适于常规分析, 比色法²⁻⁹虽简单、方便, 但受反应时间限制, 只适于手工法操作。为此我们合成了水溶性新显色剂 2-(5-溴-2-吡啶偶氮)-5-[(*N,N*-二羧基甲基)氨基]苯酚(5-Br-PADCAP)并进行了血清铁的自动化测定的方法学研究, 结果满意。

1 材料和方法

1.1 原理 在 pH 6.5 HAc-NaAc 缓冲介质中, 血清铁在铁解离剂和非离子表面活性剂的作用下从血清蛋白质中裂解开来, 并被维生素 C 还原成 Fe^{2+} , 生成的 Fe^{2+} 与 5-Br-PADCAP 反应形成紫红色络合物, 用自动生化分析仪比色测定。

1.2 仪器与试剂 UV-2201 紫外分光光度计(日本岛津), 日立 7170 全自动生化分析仪, pH-3C 酸度计(上海雷磁分析仪器厂)。5-Br-PADCAP 的制备: 由 *N,N*-二乙酸间氨基苯酚和等量的 5-溴-2-氨基吡啶重氮盐偶联而得, 熔点(分解) 188℃。铁标准液: 17.90 $\mu\text{mol/L}$ 。显色液: 含维生素 C、血清铁解离剂、5-Br-PADCAP、表面活性剂、掩蔽剂、抗氧化剂、pH 6.5 HAc-NaAc 缓冲液。

2 实验结果

2.1 自动分析参数 反应类型: 终点法; 反应温度: 37℃; 波长: 546/700 nm (主/次); 样品: 30 μL ; 显色液: 250 μL ; 10 min 读取测定数据。

2.2 计算 血清铁浓度($\mu\text{mol/L}$) = $(A_U/A_S) \times 17.90$

A_U ——样品的吸光度; A_S ——标准品的吸光度。

2.3 吸收光谱 以水为参比, 以试剂空白为参比, 测得标准管、测定管二者络合物最大吸收波长均在 557 nm 处, 由于绝大多数自动化分析仪无此波长, 故选用 546 nm 为主波长。

2.4 反应动力学曲线 选择不同浓度的样品用本法在 UV-2201 紫外分光光度计上作动力学曲线, Fe^{2+} 达 50 $\mu\text{mol/L}$ 时

反应在 400 s 已达终点。

2.5 酸度选择 5-Br-PADCAP 与 Fe^{2+} 在 pH 6.0~7.0 范围内形成稳定络合物, 吸光度最大且恒定。选择酸度为 pH 6.5。

2.6 线性范围 选择一个混合血清分成 2 份, 一份加入 Fe^{3+} 标准液, 使其成为高值(50 $\mu\text{mol/L}$)样品, 然后把这 2 份样品等量混匀产生中间值, 再分别将中间值和低值、中间值和高值等量混匀, 共产生 5 个不同值的样品, 在日立 7170 自动分析仪上按本法从低值到高值测定, 记录浓度 C 和吸光度 A , 回归方程和相关系数分别为 $A = 7.42 \times 10^{-3}C - 0.005$, $r = 0.9997$, 表明 Fe^{2+} 含量在 (0~50) $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性良好, 表观摩尔吸收系数为 $7.30 \times 10^4 \text{ L} / (\text{mol} \cdot \text{cm})$, 灵敏度为 5-Br-PADAP 自动分析法的 1.65 倍。

2.7 回收实验 取已测得 Fe^{2+} 含量为 18.97 $\mu\text{mol/L}$ 的混合血清标本, 分别加入 8.95、17.90、26.85 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{3+} 标准液进行回收实验。回收率分别为 102.9%、99.6%、97.3%, 平均回收率为 99.9%。

2.8 精密度 将一份混合血清分为 12 份, 按本法测定, 测得血清铁平均值为 18.47 $\mu\text{mol/L}$, 批内变异系数(CV)为 0.018。另取一混合血清连续测定 6 天, 每天平行 2 次, 测得血清铁平均值为 19.63 $\mu\text{mol/L}$, 批间 CV 为 0.026。

2.9 方法对比实验 用本法和原子吸收法^[1]分别测定 20 例血清标本, 本法测得的平均值($\bar{y}$)为 19.90 $\mu\text{mol/L}$, 原子吸收法测得的平均值($\bar{x}$)为 19.97 $\mu\text{mol/L}$, 回归方程为 $y = 1.009x - 0.194$, $r = 0.9918$, 经 t 检验, 两者差异无显著意义($P > 0.05$)。

2.10 干扰实验 在本法测定条件下, Zn^{2+} 含量少于 45 $\mu\text{mol/L}$ 、 Cu^{2+} 含量少于 60 $\mu\text{mol/L}$ 、 Ca^{2+} 含量少于 5 mmol/L、 Mg^{2+} 含量少于 4 mmol/L 不干扰, 血清中其他常量和微量元素 10 倍量不干扰。

2.11 参考值 选择 96 名体检合格成年人, 男 53 名, 女 43 名, 年龄 19~58 岁。空腹静脉采血, 用本法测得血清铁含量($\bar{x} \pm s$)为 (20.19 $\pm$ 5.11) $\mu\text{mol/L}$ 。参考范围($\bar{x} \pm 2s$): 9.97~30.31 $\mu\text{mol/L}$ 。

3 讨论

实验表明, 要建立一种血清铁的直接、准确的自动分析法, 必须首先使铁离子从血清蛋白中快速裂解开来, 然后在还原剂、掩蔽剂的存在下, 选择性地与显色液作用显色。我们实验发现, 测定体系的 pH 值越低, 血清铁裂解速度越快, 但 pH 过低(pH < 3.5), 血清蛋白易浑浊, 非离子表面活性剂

如TritonX-100、OP、Brij-35等的加入可促进血清铁的裂解,并可使测定体系保持清亮;某些酰胺类衍生物如TGA、 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 可显著提高血清铁的裂解速度。在本法选定的测定体系下,血清铁在显色剂中保温约6 min即可裂解并显色完全。

有人用5-Br-PADAP建立了血清铁双试剂两点终点测定法,但在临床应用中发现由于5-Br-PADAP为一种醇溶性显色剂,即使使用非离子表面活性剂增溶后也易粘附在管壁上而造成管道污染。为此我们合成了水溶性新显色剂2-(5-溴-2-吡啶偶氮)-5-[*N,N*-二羧基甲基]氨基]苯酚(5-Br-PADCAP)并进行了血清铁的自动化测定的方法学研究,研究表明,本法使用水溶性显色剂替代醇溶性显色剂,不污染管道,方法直接、快速,使用微量血清即可进行测定,灵敏度是5-Br-PADAP法的1.65倍,且试剂盒成分安全、无毒,组成单一、稳定,是一种优于5-Br-PADAP自动分析法的新方法。

(在本实验用5-Br-PADCAP的合成过程中,浙江大学汤福隆教授、

浙江工业大学周执明教授给予了大量的指导,特致谢意。)

参考文献:

- [1] 叶应妩,王毓三.全国临床检验操作规程[M].第2版.南京:东南大学出版社,1997.201-202.
- [2] International Committee for Standardization in Hematology. Recommendations for measurement of serum iron in human blood [J]. Br J Haematol 1978, 38: 291-294.
- [3] Vercammen M, Goedhuys W, Boeyckens A, et al. Iron and total iron-binding capacity in serum of patients receiving iron-dextran: Kodak Ektachem methodologies, spectrophotometry, and atomic absorption spectrometry compared [J]. Clin Chem, 1990, 36: 1812-1815.
- [4] Garcia A. A highly sensitive, simple determination of serum iron using Chromazurol B [J]. Clin Chim Acta, 1979, 94: 115-117.
- [5] Tabacco A, Moda E, Tarli P, et al. An improved, highly sensitive method for the determination of serum iron using Chromazurol B [J]. Clin Chim Acta, 1981, 114: 287-290.
- [6] 连国军,李东,陈红,等.血清铁的自动分析法[J].上海医学检验杂志,2001,16(1): 128.

疑似氨基甲酸酯类农药中毒1例报告

A suspected case of carbamate pesticide poisoning

寇 辉,姜树民,赵立群,苏维广

(辽宁中医学院附属医院急诊中心,辽宁 沈阳 110032)

患者,女,53岁,2002年9月10日20:40分来诊。家属代述:患者于晚饭后约1 h出现眩晕、恶心呕吐,逐渐意识不清、抽搐、吐白沫、二便失禁。该患10余天前也曾有过类似症状,在附近医院就诊,未明确诊断,给予对症治疗后缓解。查体: T 36℃, P 86次/分, BP 140/62 mmHg (18.7/8.2 kPa), R 35次/分,意识不清,四肢皮肤湿冷,面色苍白,呼吸急促,胸廓对称,双肺满布湿啰音,心界不大,心律整齐,腹部平坦,全腹软,肝脾未触及,四肢无自主运动。实验室检查:血常规WBC $43 \times 10^9/L$, GR 85%, RBC $4.36 \times 10^{12}/L$, Hb 127 g/L, PLT $299 \times 10^9/L$, 血清胆碱酯酶(ChE) 988 U/ml(干片法,正常参考值4 650~12 220 U/ml)。尿常规,颗粒管型1~2/高倍视野,蛋白(++)。心电图示窦性心动过速,心肌供血不足。

诊断:农药中毒?因无确切服药证据,考虑不排除氨基甲酸酯类农药中毒。立即打开静脉通路,给予阿托品1 mg静注10 min后患者清醒, BP 130/80 mmHg (17.3/10.7 kPa), P 120次/分,双瞳孔约1.5 mm,对光反射存在,双肺湿啰音明显减少,此时给予彻底清水洗胃,入量=出量,约3万ml。洗胃即将结束时,患者又出现意识不清,呼吸表浅微弱,给予呼吸兴奋剂及抗感染、支持、对症治疗,同时根据症状调

整阿托品剂量及间隔时间,直至次日9:00,患者意识恢复,呼吸平稳, BP 110/70 mmHg (14.5/9.3 kPa), P 116次/分, R 18次/分,双瞳孔约2.5 mm,光反射存在,皮肤干燥,双肺呼吸音清,心律规整,复查ChE 7 060 U/ml,继续抗炎、支持、对症治疗,3 d后痊愈出院。整个治疗过程共用阿托品6.5 mg。随访1周一切正常。

根据患者症状、体征以及使用阿托品明显见效,并且胆碱酯酶活性短期内迅速恢复,综合考虑为氨基甲酸酯类农药中毒。经查实,该患是由于被他人食物中投放鼠药而致中毒。

氨基甲酸酯类农药是一种较新型的有机杀虫剂、除草剂或灭鼠剂,中毒原因以生产、使用过程不注意防护为主,急诊室以生活中误服者多见。

氨基甲酸酯类农药的作用机制与有机磷农药相似,其共性是抑制胆碱酯酶的活性,有机磷中毒时胆碱酯酶因不能水解而不易恢复,使体内乙酰胆碱积聚;而氨基甲酸酯类中毒只是其分子与胆碱酯酶结合成一种“络合物”,这种“络合物”极易水解,使胆碱酯酶的活性恢复,因而对胆碱酯酶的抑制是可逆的。确切诊断还应依据准确的接触史,并对胃内容物的毒物检定及尿酚类代谢物的测定,或提供接触、吸收的证据,方能确诊。