维普资讯 http://www.cqvip.com

144~145, 147

改良J-G法测定血清结合胆红素的影响因素探讨

第一医院检验科 黄维嘉 陈宏础 陈受熙 刘劲松 刘 宏 桂 勇

R446.1

提 要 本文通过对血清结合胆红素(Bc)测定的影响因素的探索发现亚硝酸钠浓度增高，以及反应时间延长都可使表观Bc增加;1分钟Bc受温度影响大($P<0.01$);pH1.5和1.31时的Bc明显高于pH1.17($P<0.01,0.05$)。游离胆红素在无加速剂时，也有一定程度的直接反应。

关键词 Bc; pH; 温度; 时间 胆红素，血清
中图分类号 R446.1

血清结合胆红素(Conjugate Bilirubin, Bc)是临床鉴别黄疸的重要指标。而不同测定方法差异很大。目前测定Bc的方法很多，主要是pH、试剂浓度及操作步骤不同等。为此我们对改良J-G法测定血清Bc的影响因素进行了探讨，现报道如下。

材料和方法

1、试剂

（1） 对氨基苯磺酸、重氮试剂、碱性酒石酸钠、叠氮钠等试剂祥见《全国临床检验操作规程[1]》

(2) 0.05mol/L HCl

2、方法 Bc测定：0.2ml血清加1.6ml 0.05mol/L HCl，37℃预温5分钟，再加0.4ml重氮试剂，37℃反应1分钟，以0.05ml叠氮钠终止反应，加碱性酒石酸钠1.2ml。样品空白以对氨基苯磺酸代替重氮试剂。600nm，1cm比色杯以样品空白调零比色。

结 果

1、温度对测定Bc的影响 试验发现1分钟Bc受温度影响大，37℃时的结果比20℃时平均高18.3%($P<0.01$)，而5和10分钟Bc在这两种温度时的差别无显著性($P>0.05$)。(见表1)

表1 温度对Bc(μmol/L)测定的影响

样品号	1min		5min		10min	
	37℃	20℃	37℃	20℃	37℃	20℃
1	18.1	15.7	22.0	21.5	23.9	23.0
2	18.7	14.6	26.8	21.5	27.4	22.7
3	51.2	39.6	61.1	58.2	64.6	62.3
4	53.6	41.9	70.1	69.2	75.1	74.0
5	59.4	52.4	74.0	77.7	83.2	81.6
6	106	90.2	141	148	155	160
7	146	129	201	194	194	203
8	253	213	288	313	313	330

2、时间对Bc的影响 表2(Bc浓度为6.5

维普资讯 http://www.cqvip.com

～250μmol/L)的测定结果表明三种时间的Bc差别均有显著性($P<0.01$)。如果1分钟和5分钟的结果分别与10分钟的相比较，二个比值间亦有显著性差异($P<0.01$)。(见表2)

表2 时间对Bc测定的影响

	1min	5min	10min
$n=6$			
Bc $\bar{X}$ mol/L	89.7	101	110
Bc/10′ Bc(%)	81.5	91.8	

3、pH对Bc测定的影响 我们选择了4种pH条件测定Bc(表3)。pH1.17—1.50，Bc随之递增，pH1.31和1.50间结果无显著性差别($P>0.05$)，pH1.17时则明显低于前二者($P<0.05, 0.01$)。pH1.11时因$NaNo_2$浓度高于前三者，其结果与pH1.31和1.50接近($P>0.05$)。(见表3)

表3 四种pH对Bc(μmol/L)比较

样本号	1.11*	1.17	1.31	1.50
1	4.12	4.25	4.15	4.15
2	11.4	12.2	11.4	13.4
3	23.2	15.7	23.0	23.2
4	24.5	19.2	23.0	26.0
5	53.0	47.5	53.0	53.6
6	62.3	46.0	62.9	67.0
7	66.9	63.4	66.4	70.4
8	122	106	123	145

* 1.11的$NaNO_2$浓度为0.4umol/L，其余均为0.25umol/L。

4、游离胆红素对Bc测定的影响 我们用游离胆红素(Bf)标准品(南京军区总医院检验科921029)做BC测定，见表4。可见Bf在无加速剂存在时，也可发生一定程度的直接反应，且对低浓度胆红素的干扰较大，与Chan[2]报道相似。

表4 游离胆红素 (Bf) 对Bc测定的影响

Bf μmol/L	Bc (μmol/L)			Bc/Bf(%)		
	1min	5min	10min	1min	5min	10min
38.4	1.9	3.1	4.1	4.9	8.0	10.7
153.8	5.0	7.3	10.1	3.2	4.7	6.6

讨 论

目前国际国内均推荐改良J-G法测定血清总胆红素，而Bc测定却尚未标准化。试剂配方和操作方法各异，影响了结果的可比性。

亚硝酸钠浓度的影响已得到公认，我们的试验也证实$NaNO_2$浓度为0.4mmol/L的结果明显高于0.25mmol/L。但Chan[2]等报道$NaNO_2$浓度对牛磺胆酸一胆红素无影响，而对正常个体的Bc影响大，这说明血清中有非BC的直接反应物存在。

PH也是Bc测定的主要影响因素之一。当$NaNO_2$浓度相同时，pH1.5的结果明显高于1.17，略高于1.31。其原因可能是pH1.5时的离子强度或氯离子浓度低，偶氮反应效率高。操作规程[1]也提示盐酸浓度高可使反应减慢。

Bc测定的反应时间增加，结果明显增高。Chan[2]等发现牛磺胆酸胆红素在1分钟内即可完全反应，颜色无持续加深的情况。而血清中的游离胆红素，δ胆红素及某些非胆红素的偶氮反应，随时间延长，都可使表观Bc

(下转147页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

讨　论

β-N-乙酰葡萄糖胺酶(β-N-AG)是溶酶体释放的水解酶之一，它最初在内质网内合成，故在上述两种细胞器内均呈阳性，该酶分解B-N-乙酰氨基葡萄糖的胺基糖苷键，其反应如下：2-乙酰氨基-2-脱氧β-D-吡喃葡萄糖苷 $+H_2O\rightleftharpoons$N-乙酰葡萄糖胺＋配基，亦可催化寡糖分子末端的β-N-乙酰半乳糖苷水解，β-N-乙酰葡萄糖胺酶活性高低亦反应了溶酶体的活跃状态，从本实验的组织化学反应结果，显示胃粘液细胞癌的β-N-乙酰葡萄糖胺酶的活性较管状腺癌为高，由于人体结缔组织中蛋白多糖含有β-N-乙酰葡萄糖胺及寡糖分子末端的β-N-乙酰半乳糖胺结构，故该酶可水解上述化合物，从而破坏结缔组织网状屏障，而有利于癌细胞浸润。

本实验采用有实用价值的萘酚AS--BI-β-N-乙酰葡萄糖胺作为β-N-乙酰葡萄糖胺酶的底物，选择酶组化中效果较好的六偶氮对品红为偶联剂配制孵育液，通过不同实验组的多次实验，在原法基础上找到最佳效果的pH和孵育时间，从而保证了染色的稳定性和可靠性。胃癌恒冷组织切片经其偶氮偶联反应后，形成无定形或小结晶产物，在切片上显示出β-N-乙酰葡萄糖胺酶在细胞内的定位。

β-N-乙酰葡萄糖胺酶组织化学改良法，也可用于肠癌、乳癌及其它浸润癌的恒冷组织切片中研究应用。

采用萘酚AS衍生物较其它底物水解快，与六偶氮对品红偶联，可显示最好的定位，但由于它不能以稳定的盐长期保存，必须临用前配制。

该酶组织化学方法，操作简便，易于同行掌握应用。

参　考　文　献

1　Walken R A J path 1984;143:39
2　Hayashi M, et al. J, Histochem, Cytochem 1964;12:293
3　苗德林，等. 中华病理学杂志 1987;16(14):269
4　陈啸梅，等. 组织化学手册 人民卫生出版社1982

(收稿日期1993-09-22)

(上接145页)

增加。故《临床化学诊断方法大全》认为缩短反应时间可以提高Bc测定的特异性。

温度主要影响1分钟的Bc测定，所以如采用1分钟反应时间应统一温度。并严格控制温度与时间。

参　考　文　献

1　叶应妩，等. 全国临床检验操作规程 第一版，南京:东南大学出版社 1991: 218
2　Chan K-M, et al. Chin chem 1985 31(9): 1560
3　林其燧，等. 临床化学诊断方法大全 第一版　北京: 北京大学出版社 1990: 928

(收稿日期　1994-01-20)