DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.058
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0361-03

技术方法

四苯硼钠和对苯苯酚协同增强化学发光的研究

Study on synergistic action of sodium tetraphenyl borate and para-phenylphenol on chemiluminescence

骆建新[1],郑崛村[1],王伦安[1],洪华容[1],李晋川[1],伍莉萍[2],杨秀岑[2] ([1]第三军医大学成都军医学院医学检验学教研室,成都 610083;[2]华西医科大学药学院应用化学教研室,成都 610041)

提 要:目的 探讨四苯硼钠(Sodium tetraphenyl borate, NaTPB)和对苯苯酚(Para-phenyl-phenol, ppp)的协同增强作用。方法 应用流动注射化学发光分析技术对 Luminol-H_2O_2-HRP 增强发光体系中各组分的浓度进行初选及均匀设计优化,确定出该发光体系的最佳浓度组合。结果 鲁米诺为 6×10^{-4} mol/L, H_2O_2 为 1×10^{-3} mol/L, NaTPB 为 6×10^{-4} mol/L, ppp 为 4×10^{-4} mol/L 时协同增强作用最强;该发光体系用于流动注射化学发光测定时,检测限可达 8.46×10^{-12} g/mL,分析灵敏度、重现性比两种增强剂单独使用时都高。结论 在一定条件下,增强剂 NaTPB 和 ppp 之间有明显的协同增强作用。

四苯硼钠(Sodium tetraphenylborate, NaTPB)是发光增强剂大家族的一个新成员,是中国学者张文艳等[1]于1998年发现的。NaTPB易溶于水,适于多种发光体系,有广泛的应用前景。

化学发光分析(Chemiluminescent assay, CLA)广泛采用增强剂提高分析灵敏度[2~4]。1996年 Ji[4]与 Kricka[5]研究增强剂的协同增强作用,发现增强剂联苯硼酸与8-氨基-5-氯-7-苯基并哒嗪二酮或对碘苯酚具有明显的协同增强作用。最近,我们发现在 Luminol-H_2O_2-发光体系中增强剂 NaTPB 与对苯苯酚(Para-phenylphenol, ppp)也有明显的协同增强作用。本研究应用流动注射化学发光分析技术详细研究了 NaTPB 与 ppp 的协同增强作用。

1 材料与方法

1.1 仪器

Sartorius 4 431 型超微量电子天平(西德),IFIS-A 型智能流动注射分析仪(西安弹簧研究所),GD-1 型微光测定仪(西北有色地质研究所)。

实验所用的流动注射化学发光分析装置,见图1。

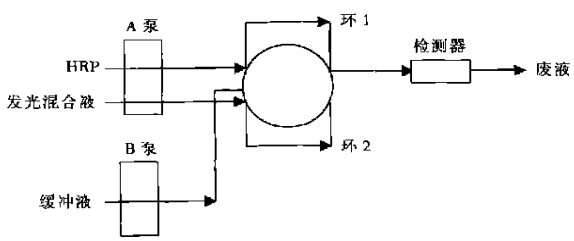


图1 流动注射化学发光分析装置

1.2 试剂

Luminol(Sigma, AG), HRP(Sigma, RZ≥3), ppp(Fluka AG), NaTPB(Sigma, AG), H_2O_2(30%),其它试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 设置分析程序 泵A(30转/分,8 s)同时将 HRP 泵入环1、发光底物混合液泵入环2,见图1;转换阀位,环2内的发光底物混合液通过泵B(6转/min, 120 s)由缓冲液冲至环1与 HRP 混合、反应发光,其发光值被检测器检测、记录,此分析程序反复循环进行。

1.3.2 增强剂分别使用时发光体系的浓度确定 以文献[1,6]和预实验提供的发光体系浓度作为本研究确定发光体系各组分浓度的基础。任意固定鲁米诺、H_2O_2和增强剂(NaTPB或ppp)三者中两者的浓度,改变另一个的浓度,按图1设计的流路与参数,测定 HRP(8×10^{-10} g/mL)的化学发光值(CL),确定发光体系的最佳浓度。

1.3.3 增强剂协同作用时发光体系的浓度确定 固定鲁米诺、H_2O_2和某一种增强剂(NaTPB或ppp)的浓度,再加入另一种不同浓度的增强剂,测定辣根过氧化物酶(HRP)(8×10^{-10} g/mL)的 CL 值,确定发光体系最佳浓度。

1.3.4 增强剂协同作用时发光体系浓度的优化 初选后,采用均匀设计法(四因素七水平),优化增强剂协同作用的发光体系,确定出各组分的最佳浓度。

1.3.5 增强化学发光流动注射分析测定 HRP 将优化后的发光体系用于 HRP 的测定,并进行方法学评价。

1.3.6 统计学处理 采用 t 检验和多元回归分析。

2 结果

2.1 增强剂分别使用时发光体系的最佳浓度

固定鲁米诺(5×10^{-4} mol/L), H_2O_2(2×10^{-3} mol/L)浓度,测定 HRP(8×10^{-10} g/mL)的 CL 值,当 NaTPB 和 ppp 浓度分别为 2×10^{-4} mol/L 和 4×10^{-4} mol/L 时 CL 值最大,见图2;同理,固定 NaTPB(2×10^{-4} mol/L), ppp(4×10^{-4} mol/L)和 H_2O_2(2×10^{-3} mol/L),测定 HRP 的 CL 值,当增强剂为 NaTPB 时,鲁米诺浓度为 3×10^{-4} mol/L 较佳,当增强剂为 ppp 时鲁米诺浓度为 6×10^{-4} mol/L 较佳;固定 NaTPB、ppp 和鲁米诺浓度,测定 HRP 的 CL 值,当增强剂为 NaTPB 时,H_2O_2 浓度为 3×10^{-4} mol/L 较佳,当增强剂为 ppp 时 H_2O_2 浓度为 5×10^{-4} mol/L 较佳。

基金项目:卫生部科学研究基金课题(941219),四川省卫生厅科学研究基金课题(000220)

作者简介:骆建新(1963—),男,四川省邻水县人,硕士,讲师,主要从事生化药物及其分析技术的研究。电话:(028)6571090

收稿日期:2000-11-08;修回日期:2001-06-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

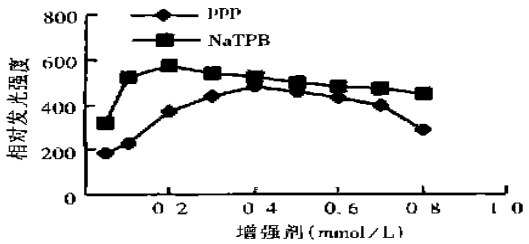
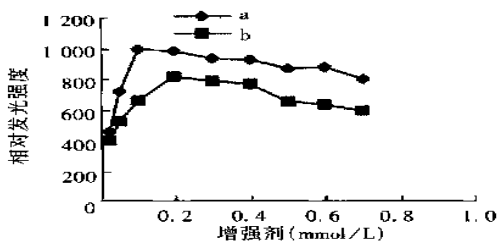


图 2 NaTPB 和 ppp 单独作用时增强剂浓度与 CL 值的关系

增强剂协同作用时发光体系中的最佳浓度: 固定鲁米诺浓度为 5×10^{-4}mol/L, H_2O_2 为 3×10^{-3} mol/L, 同时加入两种增强剂(NaTPB 和 ppp), 测定 HRP(8×10^{-10}g/mL)的 CL 值。发光体系有明显的协同增强作用, 当鲁米诺 5×10^{-4}mol/L、H_2O_2 3×10^{-3}mol/L、NaTPB 1×10^{-4}mol/L 和 ppp 4×10^{-4} mol/L 时协同作用最强, 见图 3。该发光体系用于 HRP(8×10^{-10}g/ml)催化发光, 其发光值比 NaTPB 和 ppp 单独作用时分别增强 82.07% 和 77.16%($P<0.01$), 见表 2。



a: 固定 ppp 浓度(4×10^{-4}mol/L); b: 固定 NaTPB 浓度(2×10^{-4}mol/L)

图 3 NaTPB 和 ppp 协同作用时增强剂浓度与发光值的关系

2.2 增强剂协同作用时发光体系的优化浓度

用于优化协同增强发光体系的"均匀设计"方案和实验结果见表 1。测定结果经多元回归统计, 得回归方程: $Y=625.6594+21.8149A-6.0719B+33.1100C+48.6266D$, $R^2=0.9997$, $F=803.3517$($P<0.05$)。根据方程确定出发光体系的优化浓度: 鲁米诺为 6×10^{-4} mol/L, H_2O_2 为 1×10^{-3} mol/L, NaTPB 为 6×10^{-4}mol/L, ppp 为 4×10^{-4}mol/L。该发光体系用于 HRP(8×10^{-10}g/ml)催化发光, 其发光值比初选体系的发光值再增强 25.69%($P<0.01$), 见表 2。

表 1 "均匀设计"方案和实验结果($n=3$)

Test No.	A	B	C	D	Y_1	Y_2
1	1	2	2	5	863.26	863.2
2	2	4	5	4	1002.38	1005.054
3	3	6	1	3	836.33	833.6562
4	4	1	4	2	939.69	936.5391
5	5	3	0.9	1	791.23	794.9405
6	6	5	3	0.9	869.92	869.2778
7	7	7	6	6	1226.19	1226.273

A, B, C, D 分别为鲁米诺, 过氧化氢, 对苯苯酚和四苯硼钠, Y_1 为实际测定值, Y_2 为理论预报值

表 2 不同增强剂的增强能力的测定

实验组	增强剂	n	发光值($\bar{x}\pm s$)
A	ppp	10	556±56
B	NaTPB	10	541±43
C	NaTPB-ppp(1)	10	985±85 *
D	NaTPB-ppp(2)	10	1238±98 #

(1): 优化前, (2): 优化后 *: $P<0.01$ *vs* A, *: $P<0.05$ *vs* B; #: $P<0.01$ *vs* C

2.3 流动注射协同增强化学发光测定 HRP

将优化后的发光体系用于测定 HRP, 在 $1\times10^{-10}\sim5\times10^{-9}$ g/ml 范围内, HRP 浓度与发光强度有良好的线性关系, 回归方程为: $\lg\Delta CL=15.8991+1.420\lg[HRP]$, 相关系数 $r=0.9996$($P<0.01$), 检测限 DL = 8.46×10^{-12}g/ml, RSD=3.06%。

3 讨论

本研究应用流动注射化学发光分析技术研究 NaTPB、对碘苯酚(p-IP)和 ppp 在 Luminol-H_2O_2-HRP 发光体系中的协同作用, 发现 NaTPB 和 ppp 之间有明显的协同增强作用, 通过优化发光体系可提高分析灵敏度。但 NaTPB 和 p-IP 及 ppp 和 p-IP 之间未见明显的协同增强作用, 其原因尚需进一步研究。

为了得到满意的测定结果, 本研究详细地探讨了影响流动注射化学发光测定的各种因素, 将取样阀到检测器的距离定为 40 cm; 取样环"环 1"的容积为 100 μL, "环 2"的容积为 300 μl; 取样速度为 30 r/min, 冲样速度为 6 r/min; 缓冲液为 0.2 mol/l pH 8.5 硼酸-硼砂缓冲液; 负高压为−674 V。

传统的单环取样流动注射系统以发光底物混合液为载流, 发光底物的消耗量较大。本研究根据间歇合并带原理和柱切换技术, 以缓冲液作为载流, 对分析流路作了适当改进, 采用两个取样环对样品(HRP)和发光底物同时取样, 当取样阀换位后, 由缓冲液将环 2 内的发光底物冲至环 1 与 HRP 混合、反应发光, 其发光值被检测器检测、记录。与发光底物作载流的装置进行测试比较, CL 值不降低。可见, 缓冲液代替发光底物作为载流可大量节约发光试剂, 降低分析成本。

化学发光分析在临床检验、药物分析及环境监测等方面已得到广泛应用, 尤其是免疫分析、流动注射分析技术和增强剂的引入, 显著提高了化学发光分析测定的特异性、重现性和灵敏度, 使化学发光分析更具广阔的应用前景[7~11]。随着研究的不断深入, 将会出现更多、更好的增强剂, 更多、更好的协同增强作用, 化学发光分析法可望得到更为广泛的应用。

有关多种增强剂之间的化学发光协同增强作用及其作用机理的研究, 有待一步研究。

关键词: 流动注射化学发光; 对苯苯酚; 四苯硼钠; 协同增强作用
中图法分类号: R313 文献标识码: B

参考文献:

[1] 张文艳, 周延秀, 李 峰, 等. 增强辣根过氧化物酶催化鲁米诺化学

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

发光反应的新型增强剂四苯硼钠[J]. 分析化学, 1998, 26(1): 100—102.
[2] Kricka L J, Cooper M, Ji X. Synthesis and characterization of 4-iodophenylboronic acid: a new enhancer for the horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of luminol[J]. Anal Biochem, 1996, 240(1): 119—125.
[3] 张 捷, 王天成, 寇丽筠. 增强化学发光免疫法测定乙型肝炎表面抗原的建立和评价[J]. 临床检验杂志, 1997, 15(1): 19—20.
[4] Ji X, Kondo K, Aramaki Y, *et al*. Effecent of enhancers on the pyridopyridazine-peroxide-HRP reaction[J]. J Biolumin chemilumin, 1996, 11(1): 1—7.
[5] Kricka L J, Ji X. Super-sensitive enzyme immunoassay for thyroid stimulating hormone using a new synergistic enhanced chemiluminescent endpoint [J]. J Biolumin chemilumin, 1996, 11(3): 137-147.
[6] 杨秀岑, 伍莉萍, 陈达胜, 等. 用化学发光法测定辣根过氧化物酶几种体系的研究[J]. 华西医科大学学报, 1990, 21(3): 293—297.
[7] Shellum C, Gubitz G. Flow-injection immunoassays with acridinium ester-based chemiluminescence detection[J]. Anal chim acta, 1989, 227(1): 97—107.
[8] Liu H J, Jim C Y, Bindra D S, *et al*. al. Flow injection solid—phase chemiluminesent immunoassay using a membrane—based reactor[J]. Anal Chem, 11 991, 63(7): 666—669.
[9] Dreveny D, Michalowski J, Seidl R. Development of solid-phase chemiluminescence immunoassays for digoxin comparing flow injection and sequential injection techniques[J]. Analyst, 1998, 123(11): 2 271—2 276.
[10] 张新荣, 封满良, 吕九如, 等. 流动注射化学发光免疫分析研究(Ⅰ. 血清中已型肝炎表面抗原的测定)[J]. 化学学报, 1994, 52(1): 83—88.
[11] 邵 谦, 马望百, 封满良, 等. 流动注射化学发光免疫分析研究(Ⅱ. 偶合反应测定 HRP 及其标记物[J]. 化学学报, 1997, 55(6): 590—594

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2002)03-0363-01

个案与短篇

残角子宫妊娠误用药流钳夹引产 1 例

One case report of gestation in rudimentary horn of uterus

申 勇 (成都市龙泉驿区第一人民医院妇产科, 成都 610100)

患者 26 岁, 已婚, $G_2P_1^{+1}$。因停经 2^+ 月, 到当地卫生院就诊, 诊断为"早孕", 给予米非司酮药物流产, 半$^+$月后阴道仅少许流血, 后行清宫术。40^+ d 后, 自觉下腹部扪及一包块, B 超提示:"4^+月宫内孕", 再次口服米非司酮药物流产, 见"引产不下", 即行钳夹术, 术中未夹出妊娠组织, 1 d 后再行"利凡诺"羊膜腔内引产术, 转入我院的当日上午在卫生院静滴缩宫素下行第二次钳夹术, 仍未夹出任何组织, 患者腹痛加剧, 即于 1997 年 2 月 21 日中午转入我院。入院体检: T 36.5 ℃, P 140 次/min, R 26 次/min, BP 14/10 kPa, 痛苦病容, 面色苍白; 心肺未查见异常; 腹软, 肝、脾未触及, 下腹正中偏右可扪及约 4^+ 月孕大包块, 边界清, 不活动, 下腹有明显压痛及反跳痛。妇科检查: 已婚已产型, 阴道通畅, 其内有少许血性分泌物; 子宫左后位, 略增大, 有明显压痛, 子宫右上方可扪及约 4^+ 月孕大包块, 压痛明显, 边界清、欠活动。B 超检查: 子宫大小、形态正常, 宫腔内回声增强; 右侧附件区见一约 11.5 cm× 12.0 cm, 壁薄 0.4 cm, 中央为羊膜囊, 大小 10.1 cm× 11.8 cm, 囊内见一成形胎儿回声, 无胎心, 胎盘附着包膜右侧壁, 厚 1.9 cm, 上述包块与子宫紧邻, 右下腹探及无回声区最深径 2.0 cm, 子宫直肠陷窝探及少量暗区深 1.5 cm。血常规: 白细胞 19.5×10^9/L, 血红蛋白 92 g/L, 红血球 2.98×10^{12}/L, 中性多核细胞 0.83, 淋巴细胞 0.15, 单核细胞 0.02。尿 HCG 阳性。二氧化碳结合力 12 mmol/L。肾功、电解质均正常。入院诊断: ①子宫外孕: 腹腔妊娠? 死胎; ②宫腔感染; ③子宫穿孔? 入院后给予补液、输血、抗炎及对症治疗, 病情好转; 于 2 月 24 日在持硬膜外麻醉下行剖腹探查术, 术中见: 腹腔有少许血性渗出液, 子宫右角处有一蒂宽约 5 cm, 厚 0.3 cm, 长 3 cm 相连包块约 4^+ 月孕大, 表面光滑, 包块附着之输卵管及卵巢均正常, 子宫大小及左侧附件正常, 子宫底壁可见星形及小园形裂痕, 无活动性出血; 手术行保留右侧卵巢, 钳类蒂部切除其包块及右侧输卵管。术后剖开包块见其壁厚约 0.5 cm, 似子宫组织, 胎儿及胎盘均在包块内; 术后诊断: ①残角子宫妊娠; ②子宫穿孔; 包块组织病理检查: 残角子宫妊娠。术后通过治疗 7 d 患者痊愈出院。

讨论

残角子宫是女性生殖器发育畸形的一种, 发生率约占畸形子宫的 5%[1,2]。残角子宫妊娠一经确诊, 均行手术切除残角子宫及同侧输卵管。本例既往无痛经也无腹部包块史; 有一次正常足月妊娠分娩史, 一次人流史; 残角子宫早孕, 行人流术时, 器械不能探入残角宫腔, 仅能进入子宫腔内, 只能刮出少量妊娠蜕膜组织, 术后妊娠继续存在; 行中期引产时, 经各种引产方法均告失败; 手术后剖开残角子宫, 见一完整胎儿及胎盘; 病检证实为残角子宫妊娠; 此例由于基层卫生院缺乏对残角子宫的认识, 致误诊为"宫内孕", 而反复药物流产、清宫、引产及钳夹术的错误处理, 给患者带来严重身心损害及痛苦, 甚至危及孕妇生命; 报告该例, 引以为戒, 严格掌握药流、引产、钳夹等计划生育手术的适应症。

关键词: 子宫/畸形; 误诊
中图法分类号: R714.422 文献标识码: B

参考文献:

[1] 王淑贞 主编. 实用护产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 204.
[2] 丁曼琳 主编. 护产疾病诊断与鉴别诊断[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993. 138.

(编辑 薛国文)

作者简介: 申 勇(1959—), 女, 四川省成都市人, 主治医师, 主要从事妇产科方面的研究。电话: (028)4873123
收稿日期: 2001-06-08; 修回日期: 2001-11-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net