DOI:10.16016/j.1000-5404.1988.02.016

用碘化硝基四氮唑兰代替氯化硝基四氮唑兰比色测定血清糖化蛋白的探讨

陈芳华* 陶 濬 （第二附属医院 检验科）

1976年Flückiger等首先介绍了比色测定血清糖化蛋白。在此之后，许多学者均用不同方法进行对血清糖化蛋白的研究，但均由于设备昂贵及操作繁杂，故未被广泛采用。1983年，Johnson等报导了用NBT（氯化硝基四氮唑兰）测定血清糖化蛋白[1]，1985年滕万钟等在全国第二届检验学术会议上也介绍了这种方法。这种方法是根据糖化蛋白作为一种酮胺，而酮胺在碱性条件下可使某些四氮兰还原的原理而设计的。此法简单、快速、血清用量少、敏感性高、结果较为可靠、且不需特殊仪器，是比糖化血红蛋白测定更为敏感的糖尿病短期监测指标，适于临床推广应用。在实际摸索中我们发现，用INT（碘化硝基四氮唑兰）代替NBT，更为经济（INT的成本仅为NBT的1/10）。且用INT代替后，测得批内CV是1.08%，批间CV是1.67%，正常参考值约为197±58(117例)。现将方法及实验结果简要介绍如下：

试剂与方法

试剂 1. 0.1M碳酸盐缓冲液（pH10.8）：取无水碳酸钠9.54g、碳酸氢钠0.84g，溶于少量蒸馏水中，加水至1 000ml。2. 0.25 mmol/L INT试剂：取INT126.4mg溶于0.1M碳酸盐缓冲液（pH 10.8）1 000ml中，避光4℃保存。3. 0.127mmol/L NBT试剂：取NBT104mg溶于0.1M碳酸盐缓冲液（pH10.8）1 000ml中，避光4℃保存。

方法

	测定管	空白管
血清	0.1ml	/
蒸馏水	/	0.1ml
INT或NBT试剂	4.0ml	4.0ml

充分混匀后于37℃水溶避光放置15min，取出立即置冰水中，5 min后于721型分光光度计比色，以空白管调零。波长：INT法445nm，NBT法530 nm，光径10mm。

计算 血清糖化蛋白指数

$$= \frac{A}{\text{血清 (ml)}} \times 100 = A \times 1000/\text{dl血清}$$

正常参考值：$\bar{X} \pm 2SD$

NBT法（99例）	168±54
INT法（117例）	197±58

结果

一、吸收光谱测定 以Beckman DU-7HS扫描分光光度计测定INT及NBT法测定血清糖化蛋白时的吸收光谱。NBT法的λ max在530nm处，与文献报导相符。INT法的λ max在455nm处。

二、浓度线性范围 取糖尿病人及正常人血清分别测定，测得A值在0.6以下时与浓度呈线性关系。

三、试剂浓度对显色的影响 将INT与NBT试剂分别以不同浓度测定同一份样品，结果表明吸光度随试剂浓度的加大而增高，各种浓度之间测出的结果相差非常显著（$P<0.01$）

四、重复性试验 批内重复性(CV%)：NBT法为1.60%，INT法为1.08%，批间重复性：NBT法为2.58%，INT法为1.67%。

五、显色稳定性观察 由实验观察可知，A值与保温时间呈正相关（图1）。显色后的A值随时

*原为我校进修生，现在重庆医科大学检验系

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

间进展而缓慢升高，如改用冰水冷却，则这种情况可大大改善，A值在7 h 内基本稳定（图2）。

六、干扰试验　甘露醇、尿素、丙酮、肌酐、乳糖、蔗糖、菊糖、葡萄糖、半乳糖、麦芽糖等在通常情况下无干扰，果糖及VitC分别在15mmol/L及7.5mg/dl时对INT法有正干扰。溶血及脂血均有显著干扰。

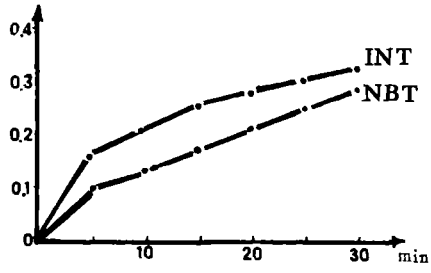


图1.　保温时间对显色的影响

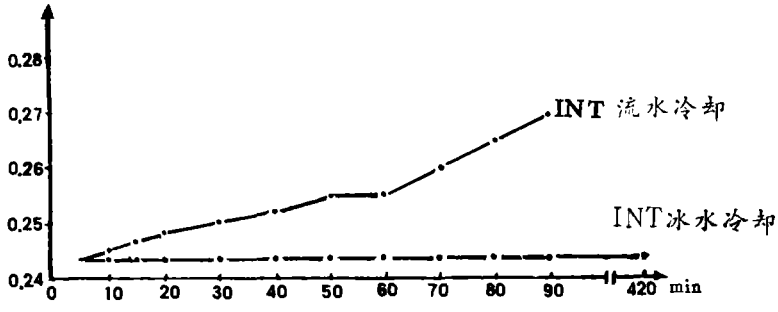


图2.　显色后流水冷却与冰水冷却结果对照

讨　论

葡萄糖可与许多蛋白质的β-氨基酸发生糖化反应。蛋白的糖化无需酶的作用[1]。根据葡萄糖的浓度就可直接发生，整个反应是一个缓慢的、相对不可逆的、非酶促的糖化反应，故糖尿病患者可有不同程度的糖化蛋白增高。血红蛋白与血清蛋白的糖化程度与血糖增高的程度有关。血清白蛋白半寿期较短，约2～3周。测定血清糖化蛋白较测定糖化血红蛋白更能准确地反映糖尿病症状改善后二周内血糖水平变化[2]。作为监测指标，如观察二月前糖尿病控制程度最好测糖化血红蛋白，而观察二周前的控制情况则以测血清糖化蛋白为好。后者是观察糖尿病治疗早期疗效的一个更为敏感的指标。

同一份样本测定，INT的A值高于NBT法，且INT法的空白值低于NBT法，吸收峰型较NBT法更好。

样品采取时应严防溶血，并要求空腹。样品采集后最好于当天测定，否则应贮于－20℃下于三日内完成。

参考文献

1. Roger N. Johnson et al. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clin Chim Acta 127 1983; 127: 87～95
2. Yukiko Hayashi et al. Fluorometric measurement of glycosylated albumin in human serum. Clin Chim Acta 1985; 149: 13～19

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