DOI:10.16016/j.1000-5404.1987.03.018

血浆葡萄糖测定——改良葡萄糖氧化酶法的探讨

楼淑芬 魏 兵（第二附属医院 检验科）

近年来，用葡萄糖氧化酶－过氧化物酶偶联体系测定血浆葡萄糖浓度的方法（简称GOD-POD法），以其特异性好、结果准确、操作简单易于掌握等优点，已被越来越多的实验室所接受，成为目前较普遍使用的方法。虽然葡萄糖氧化酶对葡萄糖的特异性很高，但由于其偶联酶是过氧化物酶，其显示反应是氧化－还原反应，故而受血中一些还原物质的干扰。胆红素就是这类还原物质中的一种，所以胆红素对GOD-POD法是有较大影响的。我们参考有关文献对GOD-POD法进行了改良（简称改良法）[1][2][3]。本文介绍了我们试用改良法的体会，对改良法的准确性作了评价，并对其消除胆红素影响的机理进行了初步探讨。

材料与方法

一、试剂

1. 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液：无水磷酸氢二钠（重庆化学试剂厂，分析纯）8.5g，无水磷酸二氢钾（西安化学试剂厂，分析纯）5.3g，溶于1000ml蒸馏水，pH调节至7.0±0.1。

2. 酶试剂：葡萄糖氧化酶（美国Sigma公司15300u/g）26.8mg，过氧化物酶（辣根）（上海生物化学研究所 Rz>3）0.6mg，4-氨基安替比林（上海试剂一厂，化学纯）10mg，叠氮钠100mg；加磷酸盐缓冲液至100ml，pH调至7.0。冰箱存放，至少可稳定三个月。

3. 酚试剂：苯酚（上海试剂一厂，分析纯）100mg溶于100ml蒸馏水中。

4. 18mmol/L 亚铁氰化钾液：亚铁氰化钾（成都化学试剂厂，分析纯）760mg溶于蒸馏水100ml。

5. 酶混合试剂：取酶和酚试剂等量混合，再加入亚铁氰化钾液，使亚铁氰化钾的最终浓度为18μmol/L。（此试剂不易保存，最好临用时现配。用后放冰箱可存放3～4天。）

6. 葡萄糖标准液：1mg/ml（重庆东方红试剂厂）。

二、操作步骤

取试管三只分别注明“u”、“S”、“B”，于“S”管内加入标准液1mg/ml 20μl；“u”管加入血浆或血清20μl；“B”管加蒸馏水20μl，三管同时加酶酚混合试剂2ml，混匀后37℃水浴15分钟，用“B”管调零，在505nm处比色。

$$\text{计算：}\frac{\text{测定管 (OD)}}{\text{标准管 (OD)}}\times 100=\text{葡萄糖 mg/dl}$$

实验结果

1. GOD-POD法高胆红素含量对血糖测定的影响

取胆红素标准（重庆东方红试剂厂分装，批号850275）30mg溶于1ml二甲基亚砜（北京医药站分装，批号840508）按不同量加入同一混合血浆中，使胆红素含量分别为30mg/dl、15mg/dl、7.5mg/dl、3.75mg/dl、1.875mg/dl及未加胆红素标准六个组，每组同时用GOD-POD法（卫生部临床检验中心推荐法）测定五次，测得葡萄糖含量列表如下：

	相当胆红素含量 mg/dl					
	30	15	7.5	3.75	1.875	未加
葡萄糖含量（$\bar{X}$）mg/dl	103.00	106.00	109.00	112.75	118.00	116.25
SD	0.71	0.71	1.13	1.56	1.13	0.83
t	6.2782	9.2451	29	1.073	1.5784	
P	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	

$t_{0.01(4)}=4.604$　　$t_{0.05(4)}=2.776$

上述结果说明用GOD-POD法测定血浆葡萄糖含量，随着血浆中胆红素含量的增高，而使葡萄糖的测定结果偏低，当胆红素含量达到7.5mg/dl时，与未加胆红素的同一血糖浓度的测定值相差非常显著。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2. 改良法高胆红素含量对血糖测定的影响

在同上述GOD-POD法相同的条件下，用改良法测定，其结果如表。

由表可见，即使胆红素含量高达30mg/dl 时，

	相当胆红素含量 mg/dl					
	30	15	7.5	3.75	1.875	未加
葡萄糖含量 ($\bar{X}$) mg/dl	120.25	119.50	117.75	115.00	118.25	116.25
SD	1.79	1.18	1.70	1.39	0.46	0.43
t	2.1698	1.9099	1.2603	1.667	2.198	
p	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	

$t_{0.05(4)} = 2.776$

用改良法测血浆葡萄糖结果几乎没有影响。

3. 两种方法对胆红素含量正常的不同血糖浓度测定的比较

用两种方法同时测定不同血糖浓度的标本71份。GOD-POD法$\bar{X}$=132.25mg/dl，改良法$\bar{X}$=132.17mg/dl，r=0.995，回归方程$\hat{y}=0.996X+0.449$，胆红素含量在正常范围内时，两种方法测定的结果基本一致。

4. 线性范围

用SF·B-1自动比色计(上海医用分析仪器厂)改良法在30～1000mg/dl 呈线性关系。用721比色计比色，因受仪器限制，改良法在30～500mg/dl线性关系好。

5. 重复性试验

取混合血浆在同一条件下用改良法连续测20次，其$\bar{X}$=139.8mg/dl，SD=3.25，CV=2.32%。取复合质控血清逐日测定，共测17天，其$\bar{X}$=83mg/dl，SD=2.78，CV=3.36%

6. 回收试验

将50、100、150mg/dl葡萄糖标准液加入血浆中，回收率依次为99.6%，100.6%，101.9%，平均为100.7%。

7. 干扰实验

在新鲜血浆中加入草酸钾（100mg/dl），肝素（50mg/dl），氟化钠（400mg/dl），尿酸（10mg/dl），肌酐（20mg/dl），均无明显干扰。加入维生素C的浓度为10mg/dl时使测定结果偏低5%。

讨　论

GOD-POD 法的显示反应是氧化-还原反应，而胆红素是一较强的还原物质。故当高浓度胆红素存在时，就会消耗一部分反应的中产物，使色素形成的量减少，导致测定结果偏低。加入亚铁氰化钾后这一干扰就会基本消除。亚铁氰化钾消除胆红素影响的机理可能是：亚铁氰化钾在有过氧化物酶存在时，被氧化成高铁氰化钾，而高铁氰化钾与酶酚试剂中的酚与4-氨基安替比林作用显红色[2]。亚铁氰化钾在该反应中不被消耗，有足够的量去抑制胆红素对偶联反应中产生的O_2的夺取。

通过GOD-POD法与改良法的比较，可以看出改良法的不足点亦是COD-POD法的缺点，而消除胆红素对血糖测定的干扰则是GOD-POD所不具备的优点。改良法在试剂的配制、操作过程中均与GOD-POD法无太大的差别，且试剂也易购买。因此，我们认为改良法做为日常常规工作是简便易行的。

参 考 文 献

〔1〕周序升。血浆（及全血）葡萄糖测定—葡萄糖氧化酶法的探讨。中华医学检验杂志 1982；5:56

〔2〕Fossati P, et al. Use of 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic Acid/4-Aminophenazone Chromogenic System Direct Assay of Uric Acid in Serum and Urine. Clin Chem 1980; 26:227～231

〔3〕Witte DL, et al. Effects of Bilirubin on Detection of Hydrogen Peroxide by Use of Peroxidase. Clin Chem 1978; 24:1778～82

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net