

CK-BB活性下降较慢,提示缺氧所致脑损伤尚未完全缓解。经纳洛酮治疗后的患者血清 CK-BB活性下降明显,与对照组比较差异无统计学意义,而且患者昏迷时间明显缩短,迟发性脑病的发生率明显降低,死亡率下降。

本资料还显示,ACOP患者血浆 ET-1的含量迅速升高,明显高于正常对照组,经纳洛酮治疗的患者血浆 ET-1的含量下降明显,提示 ET-1在 CO中毒后脑损伤的氧化应激过程中起重要的介导作用^[3],推测其机制可能与改善内皮细胞缺氧状态,提高血管内皮细胞 NOS mRNA的表达水平,抑制或降低了 ET-1分泌细胞的 mRNA表达基因程度有关^[4]。提示抑制血浆中 ET-1含量很可能是治疗 ACOP患者或改善其治疗预后的重要途径。

微波消解钼蓝比色法测定肺泡灌洗回收液中的总磷脂

Determination of total phospholipids in reclaimed BALF with microwave digestion and molybdenum blue colorimetry

白玉萍¹, 张治浩², 袁洋², 陈志远², 陈刚²

BAI Yu-Ping, ZHANG Zhi-hao, YUAN Yang, CHEN Zhi-yuan, CHEN Gang

(1 华北煤炭医学院 河北 唐山 063000 2 北戴河煤矿工人疗养院 河北 秦皇岛 066000)

摘要: 采用有机溶剂提取磷脂,微波消解处理样品,钼蓝比色法测定磷脂含量。本法检出限为 $0.02 \mu\text{g/ml}$ 线性范围 $0.05 \sim 14 \mu\text{g/ml}$ 相对标准偏差平均为 4.0% ,样品加标回收率平均 98.3% ,样品在 -20°C 冰箱可保存 30 d 本法适合肺泡灌洗回收液中总磷脂含量分析。

关键词: 微波消解; 钼蓝比色法; 肺泡灌洗回收液; 总磷脂

中图分类号: R446.1 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2009)02-0136-02

由于肺泡灌洗回收液中总磷脂含量较低,尤其是大容量肺泡灌洗回收液中磷脂含量更低,血清磷脂的分析方法不能满足肺泡灌洗回收液中总磷脂含量分析要求,本文在原化学法测定的基础上,建立了微波消解钼蓝比色法,测定肺泡灌洗回收液中总磷脂含量,现介绍如下。

1 实验方法

1.1 原理

用有机溶剂提取磷脂,硝酸 盐酸 双氧水微波消化,将磷脂全部氧化为正磷酸盐。在酸性介质中,正磷酸盐与钼酸铵反应,立即被抗坏血酸还原,生成蓝色的络合物。颜色深浅与正磷酸盐浓度成正比。经计算可得灌洗回收液中磷脂含量。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器 分光光度计,微波消解仪,智能控温加热器,

参考文献:

- [1] 李湘民, 刘郁. 急性一氧化碳中毒大鼠内皮素和肿瘤坏死因子的变化及维拉帕咪的作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2002 11: 224-226
- [2] 曹建崇, 别玲, 张红, 等. 纳洛酮在急性一氧化碳中毒综合抢救中的疗效分析 [J]. 北京医学, 2002 22: 30-32
- [3] 薛连璧, 高春锦, 庞保森. ACMP对大鼠 NO ET-1和 CEC的影响及高压氧的作用 [J]. 中华航海医学与高气压医学杂志, 2001 8: 94-98
- [4] 王伯良, 仲月霞, 曹义战, 等. 纳洛酮对急性一氧化碳中毒患者血浆 NO ET-1的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2005 14: 853-857

水浴锅; 15、25、50 ml具塞(磨口)刻度试管等。

1.2.2 试剂 3 mol/L 硫酸, 6 mol/L 和 1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)溶液, 硝酸, 盐酸, 双氧水, 氯仿萃取液(氯仿 甲醇 $=2:1$), 100 g/L 抗坏血酸溶液(贮于棕色的试剂瓶中,在冷处可稳定几周,如不变色可长时间使用), 25 g/L 钼酸盐溶液, 10 g/L 酚酞溶液, 显色液($3 \text{ mol/L H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}:2.5\%$ 钼酸铵 $:10\%$ VC $=1:5:1:1$,在不断搅拌下将钼酸铵溶液加到 100 ml 的 3 mol/L 硫酸溶液中,加水 500 ml 加入 10% 的 VC溶液 100 ml)。磷标准储备溶液:称取 $(0.4394 \pm 0.001) \text{ g}$ 于 110°C 干燥 2 h的磷酸二氢钾(KH_2PO_4),用水溶解后移至 100 ml 容量瓶中,加入大约 80 ml 冰、 1 ml 硫酸用水稀释至标线并混匀, 1.00 ml 此标准溶液含 $1000.0 \mu\text{g}$ 磷。本溶液在玻璃瓶中可贮存至少 6个月。磷标准应用溶液:将 1.0 ml 的磷标准溶液移至 100 ml 容量瓶中,用水稀释至标线并混匀,此标准溶液含 $10 \mu\text{g/ml}$ 磷,使用当天配制。

1.3 样品的采集和保存

取 500 ml 灌洗回收液加入 1 ml 硝酸或不加任何试剂于 -20°C 冰箱保存。

1.4 分析步骤

1.4.1 样品的处理 取 2.0 ml 样品于 15 ml 具塞刻度管中,取时应仔细摇匀。加氯仿 甲醇萃取液 5 ml ,置旋涡器上振荡萃取 1 min , 1500 r/min 离心 10 min ,弃去上层水相。将有机相转入微波消解罐,置智能控温加热器(或恒温水浴锅)上,控制温度在 $80 \sim 90^\circ\text{C}$ 之间,挥发出有机溶剂。加入硝酸 4.0 ml 盐酸 2.0 ml 放置 30 min 后加入 2.0 ml 双氧水,再放置 30 min ,置微波消解仪内按表 1程序消解。

收稿日期: 2008-10-08

作者简介:白玉萍(1962-)高级实验师,主要从事职业卫生与职业医学教学和科研工作。

表 1 微波消解程序

功率 (W)	温度 (℃)	升温时间 (min)	维持时间 (min)
600	50	5	2
800	100	5	5
1 000	180	5	20

消解结束后，将微波消解罐置于智能控温加热器，控制温度在 110~120℃（或将溶液转移至 50 ml 烧杯中，置电热板上加热），挥发溶液至 0.5~1.0 ml 时，应无色透明，如个别样品消化不完全，可加 2.0 ml 左右的高氯酸，直至消化完全，放冷。

以生理盐水代替试样进行空白实验，并加入与测定时相同体积的试剂。

向三角烧瓶中加入 5 ml 左右的纯水，加 1 滴酚酞指示剂。滴加 6 mol/L 氢氧化钠溶液至刚呈微红色，再滴加 3 mol/L 硫酸溶液使微红刚好退去，充分混匀。转移至具塞刻度管中，用水稀释至 25 ml。

1.4.2 工作曲线的绘制 取 7 支具塞刻度管分别加入 0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 ml 磷酸盐标准溶液。加水至 10.0 ml，各加入 2.0 ml 钼酸盐溶液充分混匀。50℃水浴放置 15 min，使用光程为 1.0 cm 比色皿，在 800 nm 波长下，以水做参比，测定吸光度。扣除空白实验的吸光度后，和对应的磷的含量绘制工作曲线。

1.4.3 样品的测定 分别取消化后的样品 10.0 ml，按工作曲线的分析步骤进行操作。扣除空白吸光度后，从工作曲线上查得磷的含量。

1.5 计算

磷含量 c_1 (mg/L) = 2.5 m/V₁，式中 m 为试样测得含磷量 (μg)，V₁ 为试样体积 (ml)；磷脂含量 c_2 (mg/L) = 25 c_1 ；全肺灌洗回收液中磷脂总量 c_3 (mg) = c_2 V₂，V₂ 为灌洗回收液体积 (L)。也可以用以下公式 c (mg) = 62.5 m/V₁ × V₂ 直接计算肺灌洗回收液中磷脂总量。

2 结果与分析

2.1 萃取效率的测试

将同一份灌洗回收液样品加入不同量的氯仿-甲醇萃取液，平行样 6 份，按照样品分析方法测定，样品磷脂测定结果见表 2。由表 2 可见，用 5 ml 萃取液与 8~10 ml 萃取效率差异无统计学意义 (P>0.05)。

表 2 萃取效率测试结果 (以磷计)

溶剂用量 (ml)	测得浓度 (均值, mg/L)
2	2.63
5	4.26
8	4.11
10	4.39

2.2 微波消解条件的选择

用 CEM 微波炉消解，取 1.0 ml 萃取液，试验不同用量、不同配比酸对消解程度影响，结果表明用 2 ml 盐酸+4 ml 硝酸+2 ml 双氧水能够消解完全，且空白值不至过高。

2.3 线性范围和检出限的测试

分别取磷标准液 1.0 ml 稀释于 10 ml 比色管中，如“1.4.2”条件下操作。空白管调零，于 800 nm 处测定吸光度，以吸光度值 0.02 对应的磷的含量确定为检出限。本法最小检测限为 0.02 μg/ml，在 0.05~14.0 μg/ml 范围内成线性。

2.4 方法精密度的测试

分别取浓度在线性范围内的 2 份灌洗回收液，按照样品测定方法分别在第 1、3、5 天进行测定，平行样 6 个，计算样品相对标准偏差 (RSD)，相对标准偏差在 2.9%~5.32% 之间，结果见表 3。

表 3 方法精密度测试结果 (以磷计)

测定时间	浓度 (mg/L)	测定浓度均值 (mg/L)	RSD (%)
第 1 天	1.65	1.58	3.45
	5.15	5.29	5.32
第 3 天	1.65	1.45	4.68
	5.15	5.01	3.68
第 5 天	1.65	1.62	2.95
	5.15	5.06	3.91

2.5 方法准确度的测试

取浓度 ≤ 1.0 mg/L (以磷计) 灌洗回收液 2.0 ml，加入标准液，使加标浓度为 2.0、5.0、10.0 mg/L，按照样品测定方法，平行样 6 个，样品加标回收率在 95.1%~102.7% 之间，结果见表 4。

表 4 方法准确度测试结果

原样品浓度	加入浓度 (mg/L)	测定浓度均值 (mg/L)	平均回收率 (%)
0.82	2.0	2.71	96.3
0.82	5.0	5.98	102.7
0.82	10.0	10.29	95.1

2.6 样品稳定性测试

将浓度为 6.18 mg/L 的样品保存在 -20℃ 冰箱，分别在第 1、3、7、14、30 天测定。以第一天测定结果为 100%，分别计算不同天数的样品保存率。由表 5 可见，样品在 -20℃ 可保存 30 d，保存率仍然在 95% 以上。

表 5 样品稳定性测试结果

放置时间 (天)	样品数	测得浓度 (均值, mg/L)	保存率 (%)
1	6	6.18	100.0
3	6	6.28	101.6
7	6	5.91	95.6
14	6	6.09	98.5
30	6	5.95	96.2

2.7 应用

应用本方法对 36 份尘肺患者肺灌洗回收液进行了测定，全肺磷脂总量在 0.78~2.26 g 之间。

3 小结

生物样品的前处理直接影响分析结果的精密度和准确度。传统的湿法消化操作时间长、试剂用量大，而微波消解具有操作简便、溶剂用量少以及样品消化完全的优点。因此，本文采用了微波消解作为样品预处理方法，在样品萃取后直接转入微波消解罐进行挥发 (有机溶剂) —消解—挥酸过程，减少了转移步骤，提高了分析方法的精密度和准确度。该方法简便，不需特殊试剂和仪器，精密度和回收率高，适用于肺泡灌洗回收液中总磷脂含量的测定。