

全血中游离原卟啉的荧光光度法

WS / T 22-1996

1 原理 原卟啉为一荧光物质。用乙酸乙酯—乙酸混合液破坏红细胞，使原卟啉溶出，再用盐酸萃取游离的原卟啉。在激发波长403nm，发射波长605nm处测量荧光强度定量。

2 仪器

- 2.1 具塞试管，10ml。
- 2.2 蛋白吸管。
- 2.3 旋涡混合器。
- 2.4 具塞离心管，10ml。
- 2.5 微型称量瓶。
- 2.6 荧光光度计，按激发波长403nm和发射波长605nm，选择合适的激发滤光片与发射滤光片，石英比色杯。

3 试剂 实验用水为蒸馏水。

- 3.1 盐酸。
- 3.2 盐酸溶液，0.5mol / L。
- 3.3 生理盐水，含氯化钠8.5g / L。
- 3.4 乙酸乙酯—乙酸混合液，4+1。
- 3.5 硅藻土生理盐水悬浮液，25g / L。
- 3.6 原卟啉标准溶液：称取原卟啉0.50mg(如为二钠盐则称取0.54mg)，加浓盐酸1.2~1.3ml。待原卟啉溶解后，定量转移入10ml容量瓶中，用水稀释至刻度。此溶液为50 μ g/ml标准贮备液。临用前，取出0.1ml置于50ml容量瓶中，用乙酸乙酯—乙酸混合液稀释至刻度。此溶液为0.1 μ g/ml原卟啉标准溶液。

4 样品的采集、运输和保存 取末梢血20 μ l，注入盛有0.1ml生理盐水的具塞试管内，加塞混匀。于冰瓶中运输，置于4℃冰箱内保存。

5 分析步骤

- 5.1 样品处理：血样中加入1.0ml乙酸乙酯—乙酸混合液，混匀。供测定。
- 5.2 标准曲线的绘制：取6支具塞离心管，各加0.1ml生理盐水，分别加入0.0、0.10、0.30、0.50、0.70、1.00ml标准溶液，和1.0、0.9、0.7、0.5、0.3、0.0ml乙酸乙酯—乙酸混合液，配制成0、0.01、0.03、0.05、0.07、0.10 μ g原卟啉标准系列。混匀后，向各管中加入0.15ml硅藻土悬浮液和3ml乙酸乙酯—乙酸混合液。置于旋涡混合器上混合10s~5s(或振荡30s)后，于2000r / min离心15min。将上清液分别移入另一组具塞离心管中，各加4ml盐酸溶液，加塞，于旋涡混合器上混合20s~30s(或振荡3min)。待分层后，用水泵吸去上层有机相。取下层盐酸溶液，以第1管作为参比，测量荧光强度。以原卟啉含量(μ g)对荧光强度绘制标准曲线。

5.3 样品测定：用测定标准系列的操作条件测定样品溶液。由标准曲线得原卟啉含量(μ g)。

6 计算 按式(1)计算血中原卟啉的浓度：

$$C = \frac{m}{V} \times 100 \quad (1)$$

式中：C—血中原卟啉的浓度，μ g/100ml；m—由标准曲线得原卟啉

的含量， μg ； V —分析时所取血样体积， ml 。

7 说明

7.1 本法的最低检测浓度为 $5\mu\text{g}/100\text{ml}$ (按取 20μ 血样计)；测定范围为 $0\sim 0.1\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ ；批内精密度为 $2.4\%\sim 5.3\%$ ；批间精密度为 $4.3\%\sim 7.0\%$ (原卟啉含量为 $0.01\sim 0.1\mu\text{g}$ ， $n=6$)；血样加标平均回收率为 74.4% (加标量为 0.03 ， 0.05 ， $0.07\mu\text{g}$ ， $n=6$)。

7.2 所用玻璃器皿需预先经清洁液浸泡，不能用含荧光增白剂的洗涤剂洗。测过高浓度原卟啉的比色杯，需用盐酸溶液洗涤至荧光读数与空白一致。

7.3 本法由上海医科大学公共卫生学院屈家英等同志研制。