

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 22—1996

血中游离原卟啉的荧光光度测定方法

Blood—Determination of free erythrocyte protoporphyrin
—Fluorometric method

1996-10-14 发布

1997-05-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

中华人民共和国卫生行业标准

血中游离原卟啉的荧光光度测定方法

WS/T 22—1996

Blood—Determination of free erythrocyte
protoporphyrin—Fluorometric method

1 主题内容与适用范围

本标准规定了血中游离原卟啉的荧光光度测定方法。最低检测浓度为 $5 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 。
本标准适用于正常人和接触铅的工人血液中游离原卟啉的测定。

2 原理

用乙酸乙酯-乙酸混合液破坏红细胞,使原卟啉溶出,再用盐酸萃取此溶液中的游离原卟啉,在激发光 403 nm ,发射光 605 nm 处显示其荧光谱峰,根据荧光强度进行定量。

3 仪器

- 3.1 930 型荧光光度计, 10 mm 荧光比色杯。
- 3.2 旋涡混合器。
- 3.3 离心机。
- 3.4 $1/10$ 万天平。
- 3.5 刻度吸量管, $1, 2, 5, 10 \text{ mL}$ 。
- 3.6 血红蛋白吸管。
- 3.7 试管, 10 mL , 具塞。
- 3.8 微型称量瓶。
- 3.9 容量瓶, $25 \text{ mL}, 50 \text{ mL}$ 。
- 3.10 水泵。

4 试剂

本标准所用试剂除另有说明者外,均为分析纯试剂。

- 4.1 实验用水:蒸馏水,或具有同等纯度的去离子水。
- 4.2 盐酸, $\rho_{20} = 1.19 \text{ g/mL}$ 。
- 4.3 乙酸乙酯-乙酸混合液(4+1)。
- 4.4 盐酸溶液, 0.5 mol/L 。
- 4.5 生理盐水,氯化钠 8.5 g/L 。
- 4.6 硅藻土生理盐水悬浮液, 25 g/L 。
- 4.7 原卟啉标准溶液:
 - 4.7.1 储备液:用十万分之一的天平精确称取 1.25 mg 原卟啉,加浓盐酸约 2.5 mL ,待原卟啉溶解后,转入 25 mL 容量瓶中,用重蒸水淋洗称量瓶,并入容量瓶中,并稀释至刻度。此溶液 $1 \text{ mL} = 50 \mu\text{g}$ 原卟啉(如为原卟啉钠盐或原卟啉二甲基酯则分别应称取 1.35 mg 和 1.28 mg)。

中华人民共和国卫生部 1996-10-14 批准

1997-05-01 实施

4.7.2 应用液:取储备液 0.1 mL 置 50 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯-乙酸混合液稀释至刻度。此溶液 1 mL=0.1 μg 原卟啉。

4.8 质控样:用标准血样、接触者混合血样或加标血样作质控样。

5 采样、运输和保存

取末梢血 20 μL,直接注入到有 0.1 mL 生理盐水(4.5)的试管内,加塞,混匀,置冰瓶中运送,于 4℃ 冰箱内保存。

6 分析步骤

6.1 仪器操作条件

选用 42# (581 光电比色计滤光片,420 nm)为激发光滤光片和 55# (550±10 nm)荧光滤光片。

6.2 标准曲线的绘制

6.2.1 取 6 支 10 mL 具塞试管,按下表配制标准管。

FEP 标准管的配制

| 管 号 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------|-----|------|------|------|------|------|
| 生理盐水(4.5),mL | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 原卟啉标准应用液(4.7.2),mL | 0 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.0 |
| 乙酸乙酯-乙酸混合液(4.3),mL | 1.0 | 0.9 | 0.7 | 0.5 | 0.3 | 0 |
| FEP 含量,μg | 0 | 0.01 | 0.03 | 0.05 | 0.07 | 0.10 |

6.2.2 各管混合均匀后,各加 0.15 mL 2.5% 硅藻土悬浮液(4.6),3 mL 乙酸乙酯-乙酸混合液(4.3)。

6.2.3 各管分别置旋涡混合器上混合 10~15 s(或振荡 30 s)后,于 2 000 r/min 离心 15 min,将上清液分别倒入另一清洁的 10 mL 具塞试管中,各加 4 mL 0.5 mol/L 盐酸(4.4),加塞,于旋涡混合器上混合 20~30 s(或振荡 3 min),待分层后,用水泵(或毛细吸管)吸去上层有机溶剂,取下层盐酸溶液于荧光光度计上以零管作参比进行荧光强度测定。

6.2.4 以 FEP 含量为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制标准曲线。

6.3 样品测定

将血样从冰箱中取出,摇匀,加 1.0 mL 乙酸乙酯-乙酸混合液(4.3),以下步骤按 6.2.2 和 6.2.3 条操作,从标准曲线上查出血样中 FEP 含量。在测定前后及每测定 10 个样品后,作一次质控样测定。

7 计算

按下式计算血中 FEP 的浓度:

$$X = \frac{m}{V} \times 1000$$

式中: X——血中 FEP 的浓度,μg/L;

m——由标准曲线上查出血样中 FEP 含量,μg;

V——分析时所取血样量,mL。

8 说明

8.1 本标准的最低检测浓度为 5 μg/100 mL 血;测定范围 0.001~0.1 μg FEP/20 μL;批间精密度 CV = 4.3%~7.0%,批内精密度 CV = 2.4%~5.3%(FEP 范围 0.01~0.1 μg,n=6);准确度:血样加标平均回收率为 96.6%(加标浓度:0.03,0.05,0.07 μg,n=6)。

8.2 用荧光法测定血中 FEP, 经用正交试验进行最佳测定条件选择, 得出最佳条件是: 盐酸的浓度为 0.5 mol/L, 乙酸乙酯-乙酸的比例为 4+1, 硅藻土悬浮液用量为 0.15 mL, 振摇时间为 5 min, 现改用旋涡混匀器可减少为 20~30 s。全过程在 30 min 内完成。

8.3 本法与荧光分光光度法对比, 96 个样本测得结果的相关系数 $r=0.9796$, $tr=47.02$, $p<0.001$, 提示相关系数有非常显著意义。但当血中 FEP 值低于 $20 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ 时, 荧光分光光度法的灵敏度高。本法应用于接触者(一般 $\text{FEP}>50 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$) 的监测是不受影响的。

8.4 对方法的可行性和检测效果作了验证, FEP 值与空气中铅浓度呈现很好的剂量反应关系。

8.5 质控样用标准血样时可考察准确度与精密度。使用接触者血样或加标血样则可考察其精密度。

附加说明:

本标准由卫生部卫生监督司提出。

本标准由上海医科大学公共卫生学院负责起草。

本标准主要起草人屈家瑛。

本标准由卫生部委托技术归口单位中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所负责解释。