

· 药品检验 ·

尿中雌激素总量的荧光分光光度测定

宁波微循环与莨菪药研究所(宁波 315000) 袁维芳 指导 杨国栋

测定尿中雌激素方法,主要采用比色法、荧光法、气相色谱法等,⁽¹⁻⁴⁾应用最广泛是Brown的分光光度法,但该法步骤复杂溶剂消耗量大,难以供临床研究推广之用。1968年Brown⁽⁵⁾提出了荧光测定法,并于1974年综述了荧光法测量尿中雌激素的应用概况。1973年Lever⁽⁶⁾,在Kober显色剂中加入了 FeSO_4 以减少荧光的淬灭之用,同年Mahesh⁽⁷⁾改进了Kober试剂,并用氯仿代替四氯乙烷。国内程务本⁽⁸⁾等用改良Kober试剂用荧光法测定了避孕片中炔雌醇含量。荧光法具有快速、简易、方便等特点。

本文对几种荧光反应方法进行了实验比较,并对影响荧光强度和稳定性的一些因素进行了分析。设计了常规操作方法,并对此法的准确性、重现性和灵敏度进行了考核。

一、仪器和试剂

1. 仪器:为日立F-3000型荧光分光光度计。

2. 试剂:标准雌三醇,用英国Serva公司(批号810730)贮存液,为10 mg/100ml的无水乙醇溶液。

二、实验部份

1. 几种荧光反应试剂的比较

文献中所用的Kober试剂配方不同。Brown法,用66% H_2SO_4 内含2%对苯二酚;Lever法,用66% H_2SO_4 内含0.5% FeSO_4 ; Mahesh法,用65% H_2SO_4 ,我们对上述三种试剂的荧光强度和稳定性进行了

比较。

① 荧光强度的比较 各取100 ng雌三醇,分别加Kober试剂各1 ml,在沸水浴中加热40 min,后立即置于冰水中冷却,并加0℃蒸馏水1.5 ml,及Ittrich试剂(对硝基苯酚试剂)4 ml,振荡2 min后立即离心,取下层氯仿液测荧光强度,结果如表1所示:

表1 方法与荧光强度关系

方 法	荧 光 强 度
Brown 法	51.3
Lever 法	58.7
Makesh 法	89.9

以Makesh法荧光强度最高。

② 荧光的稳定性:雌激素经Kober反应,Ittrich试剂萃取后,荧光量不稳定。我们比较了三种荧光反应方法的荧光消退速度。结果如图1所示。

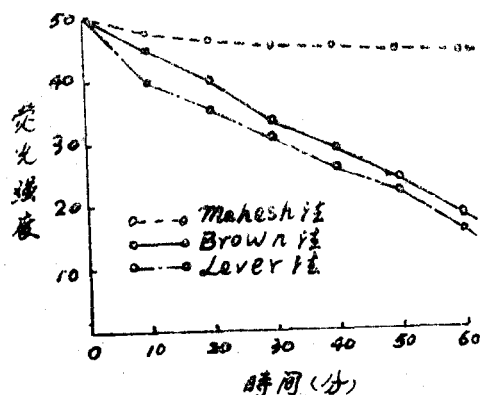


图1 荧光的稳定性

从图1可看出Mahesh方法产生的荧光最稳定,在荧光反应后1h荧光消退20%,如荧光测定过程能在30 min内完成,荧光消退可控制在10%以内。

2. 雌三醇荧光光谱的扫描

测定激发光谱时,荧光单色器波长置于550 nm狭缝5 nm,激发单色狭缝为2 nm,测定荧光光谱时,激发单色器波长置于535狭缝2 nm,荧光单色器狭缝5 nm,得出最大激发波长和最大荧光波长。结果如图2所示:

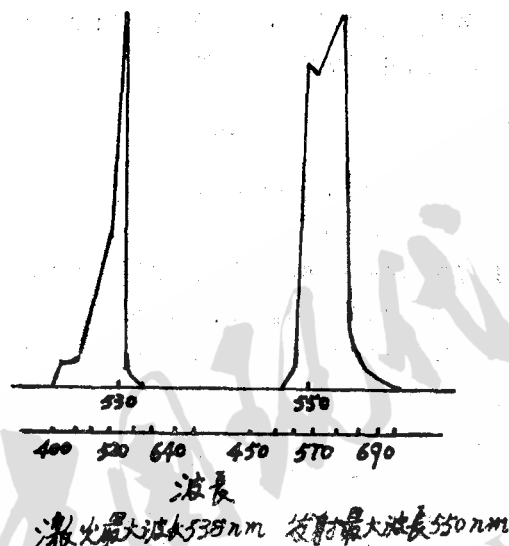


图2 雌三醇荧光光谱图

雌三醇的激发最大波长 E_x 535 nm, 荧光最大波长 E_m 550 nm。

3. 其他反应条件的选择

① 比较有机溶剂对雌激素荧光萃取影响,结果氯仿组为 $78.2\% \pm 2.5$, 四氯乙烷组为 $48.6\% \pm 12.4\%$, 氯仿较四氯乙烷不仅荧光强度高,而且误差也小。

② 在Kober反应中,加入对苯二酚的酒精溶液比加入固体,操作方便、精确。

③ 线性 分别取雌三醇 20、40、60、80、100 ng,蒸去溶剂,按常规荧光反应显色后,测其荧光强度作图,在此范围内呈直

线通过原点(图3)。

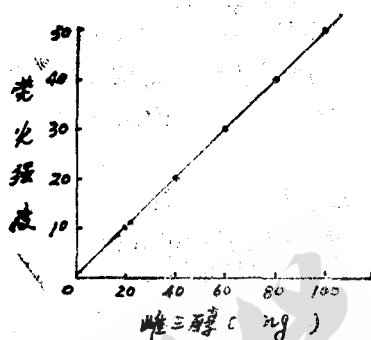


图3 雌三醇量与荧光强度的关系

4. 尿中雌激素测定的操作方法:

① 标本水解 收取24小时尿取总量的1/1,000到1/2,000,加蒸馏水补足6 ml,再加浓盐酸0.9 ml,在高压消毒锅内加热至 120°C (15磅压力 1.1 kg/cm^2) 持续15 min,冷却。

② 提取

在已水解的尿内加氯化钠1 g振摇溶解。转入60 ml分液漏斗内,加乙醚6 ml振摇,弃去下层水液。再于乙醚层中加 pH 10.5 碳酸钠溶液10 ml振摇,弃去下层水液。于乙醚层中加石油醚6 ml,再加1M 氢氧化钠6 ml振摇。将下层硷液收集于一大试管内,弃去乙醚—石油醚混合液,于大试管内加入1g碳酸氢钠振摇使之溶解。将上述溶液转入60 ml分液漏斗内,加乙醚6 ml振摇,弃去下层水液,用大试管收集上层乙醚加10%对苯二酚0.2 ml,水浴蒸干,残渣作荧光定量。

③ 荧光反应

于残渣内加65%硫酸(V/V) 1 ml,在高压消毒锅内加热至 120°C ,持续15 min或在沸水中加热40 min,加热完毕后将试管立即置于冷水中冷却。加蒸馏水1.5 ml,再加冰冷的 Ittrich 试剂4 ml,剧烈振荡2 min离心1500转/2—3 min,用吸管吸去上层硫酸液,下层氯仿液(来自 Ittrich 试剂)留待荧

光测量用。

④ 荧光测量

荧光条件 E_x 535 狭缝 2 nm E_m 550 狭缝 5 nm, 用含 100 ng 雌三醇的标准管将仪器校正到一定刻度, 然后测量标本的荧光强度。

计算雌激素总量公式:

$$\frac{\text{雌三醇标准(100 ng)}}{\text{标准荧光强度}}$$

$$\times \text{标本荧光强度} = \text{标本量(ng)}$$

$$\text{标本量(ng)} \times 1,000 (\text{取 24 小时尿的 } 1/1000) = \text{标本量(ng/24 小时尿)}$$

5. 方法评价

① 回收率

方法: 取 3 周岁男孩尿, 分 10 ng、50 ng、100 ng 三组, 分别加入雌三醇标准品, 按照常规方法进行提取, 荧光反应和定量, 其结果如表 2。

表 2 回收率试验

投入量 (ng)	平均回收率 率均差 (%)	CV (%)	SD (%)
100 (20)	87.10 ± 2.03	3.04	1.82
50 (20)	91.23 ± 2.43	3.39	2.13
10 (20)	104.59 ± 3.24	4.60	3.32

② 重现性

雌三醇 100 ng 测定 20 次的结果为: 平均值 (%) 均差 99.99 ± 0.84, 相对偏差 1.03%, 均方(标准)偏差 0.71%。

根据不同含量的 60 个双份层标本测定结果, 按 $SD = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2N}}$ 公式计算其标准差, 结果见表 3

③ 灵敏度

根据公式 $d = ts/\sqrt{N}$ 计算灵敏度。式中: $t = 2.572$, $s = SD$ 标准差, N 为样品数

表 3 尿标本的重现性

浓度范围 (ng/24 h 尿)	平均值	双份尿 标本数	SD(平均值)
0~10.0	6.06	20	±0.58(8.79%)
10.1~40.0	25.62	20	±1.93(7.54%)
40.1~100.00	68.91	20	±4.72(6.80%)

$$d = \frac{ts}{\sqrt{N}} = \frac{2.572 \times 2.41}{\sqrt{60}} = 0.8 \text{ (ng)}$$

为了使最低检出量的安全范围更大些, 根据多次测定试剂空白均不超过 0.6 ng, 故本法最低检出量应在 1 ng 左右。

小 结

根据实验结果, 初步建立了一个荧光测定尿中雌激素方法。此方法回收率 87.10~104.59%, 重现性 6.80%~8.79%, 灵敏度 0.8~1.0 ng 符合一般临床分析要求。

本实验与其他方法相比有省时、灵敏度高、操作简单等优点。

参 考 文 献

- [1] Loraine JA, Bell EJ, Hormone Assays and Their Clinical Application, 2nd ed, P226, Livingstone, Edinburgh. 1966.
- [2] Breuer H. et al: Methods of Hormone Amallet ed, P 422, Thieme, Stuttgart 1976.
- [3] Brown JB, Biochem J 1955; 60:185.
- [4] Brown JB, et al: J Endocrinol 1968; 42:5.
- [5] Brown. J. B. et al: J. Endo. 1968; 40 (3); 175-88.
- [6] Brown. J. B: Methoden Hormonbestimmung. 1975; 686-701.
- [7] Lever, M. et al: Biochem. Med. 1973; 8(2); 188-89.
- [8] 程务本、戎大梅等, 上海第一医学院学报 1981; 8(5):361.