

组胺的荧光测定法的研究

向军俭 陈华粹

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

提要 应用多因素正交实验设计等改良的组胺荧光测定法, 研究了组胺的提取和组胺-OPT荧光产生的最佳条件、方法的灵敏度等。组胺-OPT最适缩合条件为21~22°C 10±2分钟, 在pH 2~3的HCl溶液中其值最强, 室温下至少在2小时内是稳定的。灵敏度0.5ng, 线性范围1~1000ng, 全血测定仅需0.25ml样品, 回收率87~91%。

自Shore等〔1〕推荐组胺荧光测定法以来, 该方法已被广泛应用〔2~5〕。它优于生物法〔6〕和比色法〔7〕, 具有特异、敏感、重复性好、取样少、需时短等优点。本法改良后, 其灵敏度、重复性接近酶同位素组胺测定法〔8, 9〕。

十多年来, 研究该方法应用范围和特异性的资料较多〔3~5, 10~12〕, 但关于提高灵敏度、提取组胺条件以及产生组胺-OPT荧光最适酸碱度的研究却很少。为此, 本试验探讨并建立了微量组胺荧光测定法。

一、试剂和仪器 组胺二磷酸盐, 白色结晶粉末; 正丁醇, 分析纯; 正庚烷, 光学纯; 邻苯二甲醛, 瑞士Fluka厂出品; 三氯乙酸, 分析纯; 氯化钠, 优级纯; 盐酸, 优级纯; 甲醇, 分析纯; 三蒸水; MPF-4型荧光分光光度计。

二、最适实验条件的选择

1. 组胺-OPT荧光产生的酸碱条件: 组胺在碱性条件下与OPT缩合, 产生荧光物质。后者在酸性条件下稳定。酸碱度对其荧光强度有明显影响。根据Shore〔1〕、May〔12〕和本所测定痰中组胺方法, 用正交法试验, 将主要条件分为四种因素, 每因素分为四种水平(表1)。

表1 产生组胺荧光的因素与水平

因素	水平			
	1	2	3	4
A 2ml稀释组胺的HCl(N)	0.1	0.05	0.025	0.0125
B 0.5ml碱化用NaOH(N)	1.0	0.8	0.6	0.4
C 0.1ml OPT甲醇液(%)	0.2	0.15	0.1	0.05
D 0.3ml酸化用HCl(N)	5.0	4.0	3.0	2.0

将表1各因素与水平安排在正交表 $L_{16}(4^4)$ 的1、2、3、4列, 结果表明 A_2 、 B_4 、 C_3 和 D_4 的条件产生荧光最强。为选择最适的酸碱条件, 又将B、D两种因素分为四种水平。试验设计及结果见表2。

表2结果的方差分析表明NaOH各浓度之间, HCl各浓度之间差别显著(图1)。它反映了不同浓度HCl随NaOH浓度的改变而影响组胺荧光强度的变化趋势。最佳浓度为NaOH: 0.4N、0.5ml; HCl: 0.5N、0.3ml。将HCl加大到0.5ml, 可得到既强又稳定的荧光。

2. 提取组胺条件的选择: 用正丁醇将组胺从碱性水溶液中提出, 以正庚烷除去干扰物质后, 组胺移到酸性水溶液中, 将提取步骤分子A、B、C、D和E五种因素, 每因素分两种水平, 进行多因素正交试验(表3)。

本文1980年7月9日收到

表2 酸碱度对产生组胺荧光强度的影响

0.5ml NaOH (N)	0.3ml HCl (N)	相对荧光强度		ΣX
		第一次试验	第二次试验	
0.3	0.5	47	67	114
	1.0	27	52	79
	1.5	20	47	67
	2.0	27	37	64
0.4	0.5	77	77	154
	1.0	58	67	125
	1.5	52	53	111
	2.0	42	44	86
0.5	0.5	87	42	124
	1.0	67	68	135
	1.5	55	56	111
	2.0	41	45	86
0.6	0.5	16	17	33
	1.0	70	60	130
	1.5	58	57	115
	2.0	45	39	84
ΣX		784	828	1612

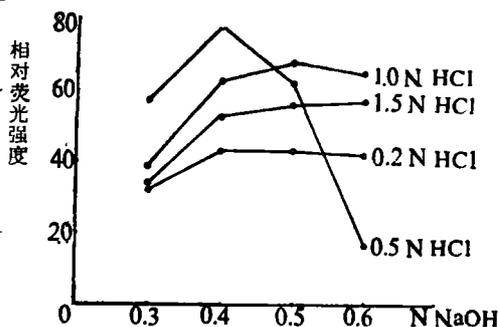


图1 酸碱浓度对组胺荧光产生的影响

表3 提取组胺的因素与水平

	水平1	水平2
A 0.1ml NaOH (N)	5.0	1.0
B 正丁醇 (ml)	4.0	2.0
C 震荡时间 (分)	5.0	3.0
D 正庚烷 (ml)	4.0	2.0
E 提取用 HCl (N)	0.1	0.05

将表3因素与水平安排在正交表 $L_{16}(2^{15})$ 的1、2、4、8和15列,进行正交试验。

试验结果方差分析表明A、B因素的两水平之间差异非常显著($P < 0.001$); C、D、E三因素的两水平间差异不显著,据此,选用表3中A、B、E因素的水平1, C、D因素的水平2。

3. 温度对组胺-OPT荧光强度的影响: 最适缩合温度和时间为: $2 \sim 4^{\circ}\text{C}$ 冰水浴中 $30 \sim 40^{\circ}\text{C}$ 分钟; $21 \sim 22^{\circ}\text{C}$ 水浴中 $8 \sim 12$ 分钟; $30 \sim 31^{\circ}\text{C}$ 水浴中 $3 \sim 4$ 分钟(图2)。

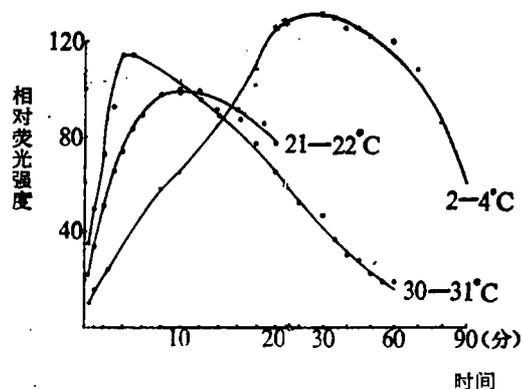


图2 组胺-OPT反应时间曲线

5. 组胺荧光的稳定性: 在 2°C 和 24°C 下,组胺荧光强度至少在2小时内稳定,24小时后约下降17%。两种温度存放没有明显差别。

4. 酸的种类和浓度对组胺-OPT荧光强度的影响: 盐酸酸化时, $\text{pH} 2 \sim 3$ 荧光强度最高且稳定; 磷酸, $\text{pH} 3 \sim 6$ 荧光稳定; 柠檬酸, 没有明显稳定范围(图3)。

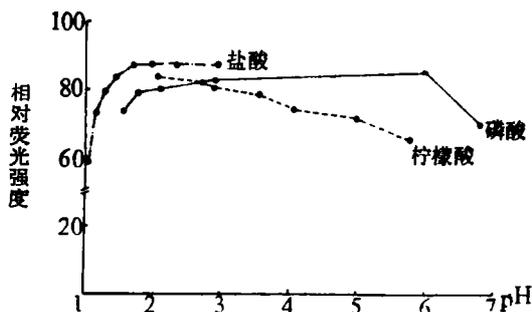


图3 酸的种类及浓度对组胺荧光强度的影响

三、实验方法及其特异性和敏感性

1. 血液样品的处理: 肝素抗凝全血0.25ml, 加三蒸水1.4ml, 完全溶血后, 缓缓加入25% (W/V) 三氯乙酸0.35ml, 混匀, 4000转/分离心10分钟, 取上清1.6ml, 相当于取样的4/5。

2. 方法步骤: ①取1.6ml上清液置于已加1.5g NaCl具塞10ml试管中, 再加4.0ml正丁醇和0.2ml 2.5N NaOH, 立即混匀, 置康氏震荡器震荡5分钟, 静置后取出3.6ml正丁醇相加到已加1.2ml 0.1N HCl和2.0ml正庚烷的10ml具塞试管内, 震荡5分钟, 弃有机相, 取1.0ml HCl相置15×150mm试管中; ②1.0ml HCl相用三蒸水稀释一倍, 加0.5ml 0.4N NaOH 碱化, 混匀并迅速加入0.1% (W/V) OPT 甲醇液0.1ml, 立即混匀并在21~22°C反应10分钟, 加0.5ml 0.5N HCl酸化以终止缩合反应, 并使荧光物质稳定; ③试剂空白: 步骤②中依序加0.5ml 0.5N HCl, 0.1ml 0.1% OPT 甲醇液, 0.5ml 0.4N NaOH。

3. 组胺工作曲线: 组胺二磷酸盐分子量为307.148, 标准液浓度按碱基计。碱基与组胺二磷酸盐分子量比为1:2.763。称量前将组胺二磷酸盐减压干燥2小时。用0.1N HCl 稀释成100μg/ml后, 以0.1N HCl 稀释成10μg/ml, 分装小瓶, 冰冻保存。

取10mg/ml标准液, 用1.0N HCl 稀释成100ng/ml, 分别取1.0、0.8、0.6、0.4、0.2ml, 并以0.1N HCl 补足至1.0ml, 空白用0.1N HCl, 1.0ml, 另向各管加三蒸水0.5ml, 25%三氯乙酸0.1ml, 经方法步骤①与②, 为组胺内标准工作曲线; 不加25%三氯乙酸, 仅通过方法步骤②, 为组胺外标准曲线(图4)。

4. 方法的特异性: 用MPF-4型荧光分光光度计连续扫描绘图, 比较外标准与内标准组胺的激发光光谱和荧光光谱, 二者一致; 血样品组胺与内标准组胺的激发光光谱和荧光光谱一致(图5、6)。

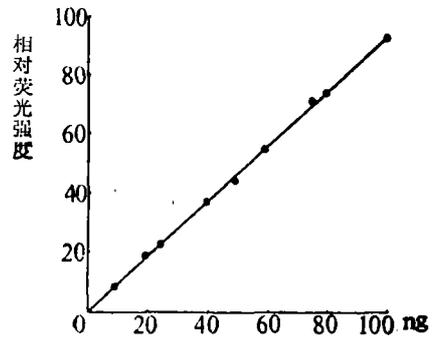


图4 组胺工作曲线

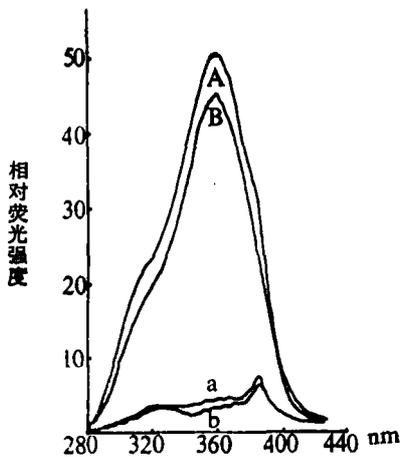


图5 组胺激发光光谱

注: 标准组胺(A)及其空白(a); 人血中提取的组胺(B)及其空白(b)

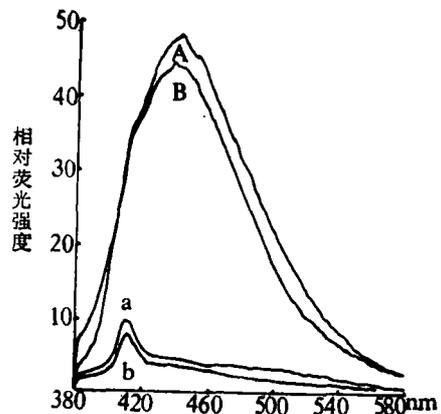


图6 组胺荧光光谱

注: 标准组胺(A)及其空白(a) 人血中提取组胺(B)及其空白(b)

5.方法的敏感性:本方法测定组胺的线性范围1~1000ng,灵敏度0.5ng,1~10ng呈良好线性关系。

6.回收率与计算:用相同浓度组胺作外标准与内标准测定其荧光强度,根据 $\frac{F_1 \times 4}{F_2 \times 3} \times 100\%$ 公式计算回收率。 F_1 为组胺内标准荧光值, F_2 为组胺外标准荧光值。本实验回收率87~91%。

四、讨论

本实验对组胺的提取和荧光产生的条件做了较大的改进。其灵敏度0.5ng,为Shore法^[1]的10倍,是Anton法^[3]的50倍,与酶同位素法相当^[8]。且需血量少,线性范围大,荧光物质在室温至少稳定两小时,回收率也较高。

不少作者研究了此方法的特异性问题^[3, 12, 14, 15]。胍脒(Spermidine)至少在脑组织和肌肉样品中是荧光干扰物质。根据Håkanson和Lorenz的资料^[12, 4],标准组胺与样品组胺的激发光谱和荧光光谱酷似。本试验证明,甲醛可阻止组胺-OPT的荧光形成。

应用于测定正常和病理情况下人的全血样品共1000余份。证明方法稳定。其中58例正常人的组胺值 $\bar{x} \pm Sx 86.0 \pm 4.0$ ng/ml,有的与Porter^[16]的报告相似;有的偏高,似因年龄选择之差。

实验证明,温度对组胺-OPT缩合时间有明显影响。在不同温度条件下,最高荧光产生率各异。而经典报道的最适缩合时间为3~4分钟。本实验还说明,pH值或酸的种类对荧光强度都有影响。用盐酸pH 2~3时荧光稳定且荧光值最高;磷酸pH 2~6时荧光稳定,但荧光强度比盐酸的稍低;柠檬酸随pH值的升高,荧光强度持续下降;使用HCl时,pH值2~3比1时荧光强度增加33%。而Shore^[1]最初方法用HCl调pH至1;Kremzner和Wilson^[17]报告用磷酸可以提高荧光值;Anton^[3]报告用柠檬酸产生荧光最强。

(正文试验设计由本所刘云嵘同志指导,谨致谢意)

参 考 文 献

1. Shore A P et al; J Pharmacol Exp Ther 127: 182, 1959
2. Noah J W et al; J Lab and Clin Med 62(1): 506, 1963
3. Anton H A et al; J Pharmacol Exp Ther 166(2): 285, 1969 (USA)
4. Lorenz W et al; Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physioloche Chemie, Bd, 355: 1097, Sep, 1974
5. Lorenz W et al; Hoppe-Seyler's Physiol Chem 353: 911, 1972
6. Adam H M et al; Brit J Pharmacol 12: 397, 1957
7. Lowery O H et al; J Pharmacol Exp Ther 112: 116, 1954
8. Snyder S H et al; J Pharmacol Exp Ther 153: 544, 1966
9. Beaven M A et al; Clin Chim Acta 37: 91, 1972
10. Lorenz W; Agents and Actions 5(5): 402, 1975
11. Lorenz W et al; Fresenius' Zeitschrift fur Analytische Chemie 252: 94, 1970
12. Håkanson R et al; Analyt Biochem 47: 356, 1972
13. May C D et al; J Allergy 46: 12, 1970
14. Medina M A et al; Biochem Pharmacol 15: 1627, 1966
15. Michaelson I A et al; Biochemical Pharmacology Vol 16, p 1636, Pergamon press 1th, 1967, printed in Great Britain
16. Porter J F et al; Physiol Reviews 52(2): 361, 1972
17. Kremzner L T et al; Biochem Biophys Acta 50: 364, 1961

Modified Method of Fluorometric Determination of Blood Histamine

Xiang Junjian and Cheng Huacui

(Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)

A modified method of fluorometric determination of blood histamine, improved by orthogonal way, was reported. The method of extraction and how to produce better fluorescence for improving the sensitivity were studied.

The lower margin of sensitivity of this method was 0.5ng. Its linear range was within 1-1000 ng and recovery rate was 87-91%. Only 0.25ml of blood was needed for each determination.

The optimal condition for histamine-OPT condensation was at 20-21°C for 10±2 minutes. Its fluorescence is fairly stable and well developed at a HCl solution of pH2-3 for at least 2 hours at room temperature.

儿童胸主动脉狭窄的外科治疗

郭家强等: 中华外科杂志 19(6): 323, 1981

本文报道自1964~1979年手术治疗的24例儿童先天性胸主动脉狭窄。凡具先天性胸主动脉狭窄临床症征、ECG异常、心脏扩大之儿童应作主动脉造影, 以便明确诊断, 并藉心导管术了解狭窄的确切部位及严重程度。为外科进一步治疗创造条件。本组17例曾作逆行性主动脉造影, 其中10例呈主动脉闭塞, 4例呈重度狭窄。2例为动脉导管前主动脉狭窄, 13例为导管后狭窄, 另2例为导管旁狭窄。对手术适应证及手术方式选择作了讨论, 对适用于儿童的手术方式作了详细描述。术后14例好转, 3例部分症状改进, 无1例死亡。