

- 华肺部疾病杂志(电子版),2011,4(4):324-329.
- [3] 卫生部结核病控制中心. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2009:7-14.
- [4] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 2006.
- [5] 徐秀琴,张惠霞,徐秀霞. 肺结核患者痰标本质量对抗酸杆菌的影响及护理对策[J]. 临床肺科杂志,2010,15(2):142-143.
- [6] 林波,颜建国. 结核分枝杆菌快速培养及药物敏感性试验的临床意义[J]. 中国民族民间医药,2011,07:96.
- [7] Mikhailovich VM, Lapa SA, Gryadunov DA, et al. Detection of rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by hybridization and polymerase chain reaction on a specialized TB-microchip[J]. Bull Exp Biol Med, 2001, 131(1):94-98.

- [8] 王莉莉,张莹蓉,胡忠义. 分枝杆菌快速变色培养基应用初探[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,24(8):460.
- [9] 赵永,梁庆福,林建,等. 福建省西南地区 451 例肺结核耐药监测分析[J]. 中国热带医学,2011,11(10):1238-1239.
- [10] 陈宇宁,郭平. 结核分枝杆菌耐药研究进展[J]. 基层医学论坛,2012,16(10):1321-1322.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008)[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:49.
- [12] Lemaire J F, Casenghi M. New diagnostics for tuberculosis: fulfilling patient needs first[J]. J Int AIDS Soc, 2010, 13(1):40.

(收稿日期:2011-12-11)

## • 检验技术与方法 •

## 高碘酸钠法检测冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量方法的探讨

杨 夏,赵 磊,白旭华

(新疆乌鲁木齐兵团血站质管科 830002)

**摘要:**目的 用高碘酸钠法检测冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量,对检测方法和监测流程进行探讨、评价。方法 由于国内应用较多的甘油含量化学检测法,在血站的实际检测中存在技术方法上的不足,本文借鉴《中华人民共和国药典》甘油测定法对其进行了改进;针对血站日常监测冰冻解冻去甘油血液制品按照国家标准规定留样后面临的矛盾,本文进行了探索并改进了检测方法,与原标准比较;对此建立的检测方法和流程进行了测试评价。结果 用此法检测甘油含量的相关度较高( $r=0.9999$ );检测回收率平均为 98.7%;检测  $CV \leq 3.2\%$ ;可采用 10 mL 取样量替代 15 mL 取样量。结论 本文建立的实验方法和监测流程更符合血站实际工作需要,可以达到操作简单、准确监控冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量的目的。

**关键词:**红细胞; 血液保存; 高碘酸钠法; 甘油

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.031

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2012)15-1862-03

为了延长红细胞的保存期,国内外普遍采用甘油作为保护剂对红细胞进行深低温冰冻保存<sup>[1]</sup>,此项技术有效缓解了临床稀有血型紧急用血状况,对采供血机构调剂血液库存储备以应对血液偏型或突发事件所导致的“血荒”也起到了一定作用。需要注意的是:甘油具有保水作用,其意外进入体会导致机体血容量增加,引起患者不适,在患者有妊娠、高血压等自身血容量比较高的情况下,不良症状会加重,严重者甚至有生命危险。在使用冰冻解冻红细胞之前,必须经过洗涤去除甘油保护剂,要控制洗后红细胞中甘油残留量小于或等于 10 g/L 作为底线<sup>[2]</sup>,消除甘油对人体产生的不良作用,保证输注后的红细胞能够正常发挥生理功能。本站已在 2009 年将冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量的监测作为质量控制的常规工作,开展此项检测工作中作者遇到过一些问题,并对问题进行了探讨,现将本站的检测方法和经验介绍如下。

## 1 材料与方 法

**1.1 样品来源** 2009~2011 年本站制备的冰冻解冻去甘油红细胞血液。

**1.2 仪器与试剂** 甘油(天津市百世化工有限公司),钨酸钠(天津市河东区红岩试剂厂), $H_2SO_4$ (四川西陇化工厂),高碘酸钠(天津市博迪化工有限公司),乙二醇(天津基准化学试剂有限公司),氢氧化钠(天津市大茂化学试剂厂),邻苯二甲酸氢钾(纯度为:99.8%,天津市光复精细化工研究所),分析天平(精密到 0.000 1 g,德国赛多利斯)。

**1.3 甘油标准溶液的配制** 精密称取甘油 10.1 g(纯度为 99%),置于 100 mL 的容量瓶中,用生理盐水溶解并稀释至刻度,配成 100 g/L 的储备液。分别取储备液 2.0、4.0、6.0、

8.0、10.0、12.0 mL 置于 100 mL 的容量瓶中,用生理盐水稀释至刻度,制成含甘油 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0 g/L 的甘油标准溶液。

### 1.4 甘油含量测定

**1.4.1 制备血滤液** 准确吸取混匀后冰冻解冻去甘油红细胞 5、7.5、10、15 mL,见表 1。依照表 1 所示加入相应量的蒸馏水,混匀,静置 3~5 min,再加入相应量的 16.5% 钨酸钠及 1 N  $H_2SO_4$ ,充分混匀,用定性滤纸过滤制备得到血滤液。

**1.4.2 甘油残留量的测定** 精密吸取血滤液 10 mL,加入 2.14% 高碘酸钠溶液 50 mL,摇匀,暗处放置 15 min 后,加 50% 乙二醇溶液 10 mL,摇匀,暗处放置 20 min,加酚酞指示剂 0.5 mL,用氢氧化钠(0.1 mol/L)滴定至红色,30 s 内不褪色,滴定结果用空白试验校正。每 1 mL 氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 9.21 mg 的甘油<sup>[3]</sup>。根据消耗氢氧化钠溶液的毫升数,依照下列公式计算样品甘油含量。

$$\text{甘油含量(g/mL)} = \text{NaOH(mL)数} \times (\text{样品} - \text{空白}) \times 0.00921 \times \frac{\text{滴定 NaOH 浓度}}{0.1} \div \text{血滤液(mL)数} \times \frac{V}{S}$$

注意:以上所用氢氧化钠(0.1 mol/L)滴定液使用前要进行浓度标定,标定步骤为:取在 105 °C 干燥至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.6 g,精密称定,加新沸过的冷水(避免水中的  $CO_2$  对标定的影响)50 mL 振摇,使其尽量溶解;加酚酞指示液 2 滴,用本液滴定;在接近终点时应使邻苯二甲酸氢钾完全溶解,滴定至溶液显粉红色。每 1 mL 的氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 20.42 mg 的邻苯二甲酸氢钾<sup>[3]</sup>。依照下列公式计算滴定液浓度:

滴定 NaOH 浓度 = 邻苯二甲酸氢钾称取量 × 邻苯二甲酸氢钾纯度 × 0.1 / (滴定 mL 数 × 0.026 5)

## 2 结果

2.1 对同一份冰冻解冻去甘油红细胞血液, 分别取不同量(5、7.5、10、15 mL)样品制备血滤液测定甘油含量, 各取样量平行

做 5 次, 应用 SPSS 13.0 统计软件, 做 *t* 检验, 结果: 7.5、10 mL 取样量与 15 mL 取样量测定结果比较,  $P > 0.05$ , 分别为 0.328 1、0.678 5, 结果差异无统计学意义, 5 mL 取样量 *P* 值为 0.000, 差异有统计学意义, 结果见表 1。

表 1 不同取样量制备血滤液检测甘油含量结果比较

试剂	mL(n=5)	mL(n=5)	mL(n=5)	mL(n=5)
测定样品(s)	15	10	7.5	5
水	75	50	37.5	25
16.5%Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	6	4	3	2
1 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.5	5	3.75	2.5
总体积(V)	103.5	69	51.75	34.5
测量值( $\bar{x} \pm s$ )g/L	9.766 ± 0.040 3	9.776 ± 0.033 4	9.791 ± 0.028	9.030 8 ± 0.065 4*

与 15 mL 取样量比较, \* :  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义。

2.2 线性试验和回收率计算 用本法测定 1.3 配制的甘油标准液, 将甘油浓度与滴定液消耗量进行线性回归, 相关系数为 0.999 9, 相关度高。在甘油含量测定为 4.38 g/L 的同一样品中按照甘油标准液浓度梯度加入不同量的甘油进行测定, 计算回收率, 见表 2。

表 2 回收试验结果 (n=12)

编号	甘油浓度(g/L)		回收率(%)	RSD(%)
	理论值	测定值		
1	2	1.961	98.05	2.04
2	4	3.97	99.25	1.29
3	6	5.988	99.8	1.43
4	8	7.901	98.76	2.12
5	10	9.974	99.74	1.41
6	12	11.943	99.52	1.52
7	4.38+2=6.38	6.35	99.53	1.52
8	4.38+4=8.38	8.4	100.24	1.97
9	4.38+6=10.38	10.2	98.27	2.02
10	4.38+8=12.38	12.13	97.98	2.78
11	4.38+10=14.38	13.9	96.66	3.02
12	4.38+12=16.38	15.82	96.58	3.07

2.3 重复性试验 分别测定 2 份样品 10 次, 计算 CV 值分别为 2.8% 和 3.2%。

2.4 样品测定 采用本法检测 10 份本站冰冻解冻去甘油红细胞血液甘油残留量为: 5.93、7.2、6.82、4.38、8.76、6.38、9.79、8.97、10.15、7.65 g/L。

## 3 讨论

目前, 检测甘油含量的方法主要有化学法、酶法和色谱法。酶法<sup>[4]</sup>, 专一性强, 只与溶液中的甘油特异性反应, 但需要购买试剂, 市售一般无小包装试剂, 一套试剂购买下来往往达千元以上, 而冰冻红细胞血液作为血源调剂部分, 用量少, 质量监测频率低, 购买试剂往往会造成失效浪费。色谱法<sup>[5]</sup>, 精确度高, 检测成本高, 需要配备昂贵的设备。传统的检测方法为化学法, 其准确性较高, 所需化学试剂可长期保存, 随用随配, 操作

简单, 较适用于血站工作。常用的化学法有两种: 高碘酸钠法和高碘酸法。高碘酸法需要使用亚砷酸钠(砷霜化合物), 是一种剧毒物质, 有危险性, 目前此种方法已较少使用。

国内文献报道的高碘酸钠法<sup>[6]</sup>, 作者在实际应用检测中发现, 其用溴甲酚紫作为指示剂判定终点, 由橙色滴定至蓝色的过程, 临界点颜色变化模糊, 肉眼难以判定终点, 判定的重复性差; 试验所用的 14% 高碘酸钠配制复杂, 需要加入浓硫酸以帮助溶解, 操作危险性大。作者采用《中华人民共和国药典》2010 年版(2 部)甘油含量测定中使用易配制的低浓度 2.14% 高碘酸钠溶液检测<sup>[3]</sup>, 改用酚酞作为指示剂, 滴定反应终点为无色变为红色, 临界点变化瞬间转换, 颜色鲜明, 易判定。应用此方法测定甘油含量, 检测甘油含量与滴定液消耗量显著正相关, 检测回收率在 96%~100%, 平均为 98.7%, 检测 CV ≤ 3.2%, 检测本站 10 份冰冻解冻去甘油红细胞制品甘油残留量结果为 4.38~10.15 g/L 之间。

国内有文献报道, 将解冻红细胞洗涤后离心, 直接检测上清液测定甘油残留量。作者认为不可取。因为, 在解冻红细胞洗涤后的一段时间内, 红细胞内仍存有部分甘油<sup>[7]</sup>。检测前要先使红细胞内的甘油释放, 并去除红细胞碎片和蛋白对检测的干扰, 即制备血滤液之后再检测才能得到准确结果。2012 年版《血站技术操作规程》(以下简称《规程》)血液质量控制检查方法做了明确规定<sup>[8]</sup>: 分析测定甘油含量之前要先制备血滤液。对于《规程》中要求制备血滤液需要血液样品 15 mL, 笔者认为需要商榷, 如果计算冰冻解冻去甘油红细胞其他质量监测项目及样品损耗量合计至少需要留取血样 18 mL, 众所周知, 血站 1 U 冰冻解冻去甘油红细胞制品容量一般为 180 mL 左右, 血液容量本身较少, 留样 18 mL 后的血液制品质量处于国家容量标准边缘(标容量 ± 10%)<sup>[2]</sup>, 若如控制不好, 势必会造成血液容量不合格而被判定为不合格品。虽然部分血站用 Rh 阳性血液做模拟制备用于质量监测, 但这种替代方式代表性差, 更不能做到随机化抽样, 且此血液的制备仅用于质量监测, 会造成血液资源、人力、物料的浪费, 得不偿失。为此, 作者设计试验: 用留样量分别为 5、7.5、10、15 mL 血液样品制备血滤液测定甘油含量, 实验证明 10 mL 取样量与 15 mL 取样量检测结果差异无统计学意义, 5 mL 取样量与 15 mL 取样量检测结果比较偏差较大。分析原因可能为: 该试验本身是微量检测试验, 样品取量少会导致样品的代表性差, 检测灵敏度下降所

致。本试验证实:选择 10 mL 作为留样标准,可以避免以上矛盾。

此外,在制备冰冻红细胞的过程中,按比例加入的甘油浓度会影响冻存效果和终产品中的甘油残留量。复方甘油制剂是血站的关键物料之一,为了保证血液质量,除监测血液制品中甘油残留量之外,血站质管部门还应在进货验证中监测复方甘油制剂的甘油含量。建议依照以下流程做监测:复方甘油制剂甘油标识量为 570 g/L,精密量取制剂 10 mL,加生理盐水定容至 100 mL,充分混匀后精密吸取 10 mL,用 1.4.2 方法测定。依据下列公式计算,评价实际测量甘油含量与标识量是否一致。

$$\text{甘油含量 (g/mL)} = \text{NaOH mL 数 (样品 - 空白)} \times 0.00921 \times \frac{\text{滴定 NaOH 浓度}}{0.1} \div \text{样品 mL 数} \times 10$$

综上所述,通过作者建立的甘油含量检测方法,可以达到操作简单、准确监控冰冻解冻去甘油红细胞中甘油残留量的目的,此监测流程更符合血站实际工作需要,值得推广并做进一步探讨、规范。

### 参考文献

[1] 王培华. 输血技术学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1998:62-

### • 检验技术与方法 •

## 溶血对一步法和两步法 HBsAg 酶联免疫试剂检测结果影响的研究

甄志军,李荣雪,张志红

(河北省邢台市中心血站检验科 054000)

**摘要:**目的 探讨样本溶血对一步法和两步法 HBsAg 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测结果的影响。方法 分别将 60 例阴性标本、弱阳性标本和强阳性标本人为造成不同程度的溶血,比较溶血前后不同试剂检测样本 OD 值的变化差异,分析溶血标本是否对 ELISA 试验存在干扰,一步法和两步法试剂是否存在差异。结果 对于阴性标本,一步法试剂 10 g/L 以下溶血样本检测 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),10 g/L 以上重度溶血后样本孔 OD 值、S/CO 值与溶血前比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );两步法试剂 15 g/L 以下溶血样本检测 OD 值与溶血前比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),15 g/L 以上重度溶血后样本孔 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );对于弱阳性和阳性标本,两种试剂在 5 g/L 以上溶血后样本检测 OD 值与溶血前比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 两步法试剂受溶血影响较一步法轻,轻度溶血标本对阴性标本 ELISA 试验结果无干扰,对于灰区结果和重度溶血标本需要重新取样,进行再检。

**关键词:** 肝炎表面抗原,乙型; 溶血; 酶联免疫吸附测定; 试剂盒,诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.15.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)15-1864-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)是血站系统进行献血者筛查的常用方法之一,检测对标本的要求是:空腹抽血,标本不能溶血。但是在血站日常检验工作中,经常会遇到溶血的标本,国内有许多文献报道溶血对 ELISA 试验有影响<sup>[1-2]</sup>,会对试验结果产生干扰,但多数是在 2010 年新版《中华人民共和国药典》颁布之前的试剂,2010 年版《中国药典》二部收录了 8 个按药品管理的体外诊断试剂标准。如采用 ELISA 试验原理的产品,均将一步法修改为二步法。在孵育时间方面,都大大加长。在 2010 年 10 月 1 日后,国内试剂厂家按照国家的要求对 ELISA 试剂进行了调整,为了了解溶血标本对改模后国产试剂的影响,作者对改模后的试剂进行了溶血因素对试剂影响的评估,并克服以往对溶血程度没有定量的缺点,采用了不同溶血程度的系列标本。现将结果报道如下。

### 1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 5~12 月在本站检测乙型肝炎表面

67.

[2] 中华人民共和国质量监督检验检疫总局. 全血及成分血质量要求(GB 18469-2001)[S]. 北京:中国标准出版社,2001:7-8.

[3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010.

[4] 刘春燕,张孝山,李浩泷,等. 丙酮酸激酶法检测冰冻红细胞解冻后残留甘油含量研究[J]. 天津医药,2007,35(10):794-795.

[5] 黄海涛,杨力佳,丁中涛,等. 高效液相色谱法测定果酒中的糖、甘油和乙醇[J]. 云南大学学报,2002,24(5):375-377.

[6] 林俊杰,徐蓓,邱颖婕,等. 冰冻红细胞中甘油残留量不同测定方法的比较[J]. 中国输血杂志,2002,15(5):323-324.

[7] 陈均,杨通汉,王云华,等. 冰冻红细胞解冻后残留甘油含量测定方法初探[J]. 中国输血杂志,2004,2(17):97-98.

[8] 中华人民共和国. 卫医发[2012]1 号 血站技术操作规程[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2012.

(收稿日期:2012-01-05)

抗原阴性标本 20 例;弱阳性标本(S/CO 值在 1~5 倍)20 例;S/CO $\geq$ 10 的样本 20 例,其中男 34 例,女 26 例。所有标本均无溶血、脂血、黄疸。

1.2 试剂 改模前试剂:厦门新创 HBsAg,批号 2010095114;北京万泰 HBsAg 试剂,批号 BX20100706。改模后试剂:厦门新创 HBsAg,批号 2011015102;北京万泰 HBsAg 试剂,批号 B20101204。

1.3 仪器 BEPⅢ型全自动酶免分析仪;RSP 全自动加样仪;Sunrise 酶标仪(Tecan 公司)。

1.4 方法 60 例标本,按照不同血浆和血细胞的比例配成 4 组不同浓度的标本,并置 -20℃ 冰箱冰冻后融化,使其溶血,配制成 4 组不同游离 Hb 浓度的溶血标本。同一献血者的系列溶血标本及非溶血对照标本,分别用改模前后的两种厂家的试剂进行双孔检测。取双孔的平均 OD 值。实验由同一个操作人完成,严格按照试剂说明书进行操作。结果判断:S/CO