

• 检验技术与方法 •

病毒灭活血浆亚甲蓝残留量的检测及质量标准研究^{*}

梁启忠, 葛健民, 程玉根, 柏则蓉, 掌友湖

(盐城市中心血站质量管理部, 江苏盐城 224005)

摘要:目的 探讨血浆经病毒灭活后亚甲蓝的残留量标准。方法 采用固相萃取法检测不同规格的病毒灭活血浆中的亚甲蓝的残留量, 并检测其重复性。结果 不同规格的病毒灭活血浆中的亚甲蓝的残留量均小于 $0.3 \mu\text{mol/L}$, CV 均小于 7%。结论 试验所建立的方法工作流程严谨、操作性强、方法简便、稳定性好, 能够适用于采供血机构质量管理部门的日常血液质量的检查。

关键词:亚甲蓝; 残留量; 质量标准; 固相萃取

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2148-02

输血技术是现代医学不可缺少的重要手段, 但存在可感染输血传播病毒性疾病的风险, 对血液中的病毒进行灭活是保障临床安全输血的措施之一。目前采供血机构应用较多的是亚甲蓝光化学法照射技术(MBP)照射血浆以灭活病毒, 此技术已在采供血机构开展多年。有资料表明病毒滴度的降低程度与所用的可见光强度和亚甲蓝浓度有直接关系^[1], 但亚甲蓝有致突变的可能, 而且残留量过多, 血浆的外观和色泽会发生改变, 不易被临床所接受。因此严格控制病毒灭活冰冻血浆中亚甲蓝的残留量有重要意义。笔者采用固相萃取法对血浆中的残留亚甲蓝进行萃取分离, 并检测其浓度, 此方法简便、准确、灵敏度高, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本站 2012 年度无偿献血者的血液, 按照库存病毒灭活冰冻血浆规格 50、100、150、200、250 mL, 各取样 20 份。

1.2 仪器与试剂 亚甲蓝(厂家 SIGMA-ALDRICH, INC), 甲醇(色谱纯, 上海申翔化学试剂有限公司), 冰乙酸(分析纯, 无锡市佳妮化工有限公司), Waters Oasis 小柱(厂家 Waters Corporation Milford, Massachusetts USA), 真空固相萃取装置, 隔膜真空泵(天津市津腾实验设备有限公司), 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司), Baso2000 离心机(台湾贝索企业有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 亚甲蓝标准品的制备 精密称取亚甲蓝粉末 38 mg, 置 100 mL 容量瓶中, 用水溶解并稀释至刻度, 混匀, 此为亚甲蓝储存液。精密量取亚甲蓝储存液 50 μL 置 50 mL 容量瓶中, 用血浆稀释至刻度, 混匀, 配成最终浓度为 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 的亚甲蓝对照血浆。

1.3.2 血浆中亚甲蓝的固相萃取 将 3 mL 固相萃取小柱数支装入萃取装置, 连接真空泵并检查抽真空效果。柱的预处

理: 用 6 mL 甲醇活化。加样: 在其中一个小柱中加入 6 mL 亚甲蓝对照血浆, 其他小柱中加入 6 mL 供试血浆。清洗: 待血浆完全吸入小柱后, 用 30% 的甲醇 6 mL 清洗。洗脱: 用含 1% 乙酸的甲醇溶液 4 mL 洗脱。离心: 将洗脱液离心(3 500 r/min, 10 min), 取上清液作为样品溶液。

1.3.3 亚甲蓝含量测定 用含 1% 乙酸的甲醇溶液作试剂空白, 在(654±2)nm 波长处测定各管吸光度。亚甲蓝含量计算公式: 供试血浆吸光度 ÷ 对照血浆吸光度 × 对照血浆亚甲蓝浓度($1.0 \mu\text{mol/L}$)。

1.3.4 重复性试验 取不同规格的病毒灭活血浆标本各 1 份, 重复测定 10 次, 考察试验的稳定性。

1.4 统计学处理 实验结果用 SPSS15.0 统计学软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据比较用 t 检验及方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同规格的病毒灭活血浆亚甲蓝残留量测定结果 5 种规格的病毒灭活血浆亚甲蓝残留量测定结果均小于 $0.3 \mu\text{mol/L}$, 各组间两两比较, P 均大于 0.05, 见表 1。

2.2 重复性试验结果 5 份样品检测结果的 CV 值均小于 7%, 具有较好的稳定性, 见表 2。

表 1 不同规格的病毒灭活血浆亚甲蓝残留量测定结果($\bar{x} \pm s$)

规格(mL)	n	结果($\mu\text{mol/L}$)
50	20	0.17 ± 0.05
100	20	0.16 ± 0.05
150	20	0.15 ± 0.03
200	20	0.15 ± 0.04
250	20	0.15 ± 0.04

表 2 5 份样本重复性试验结果

规格(mL)	结果($\mu\text{mol/L}$)										$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
50	0.20	0.18	0.22	0.18	0.20	0.18	0.18	0.18	0.20	0.20	0.19 ± 0.01	5.26
100	0.15	0.15	0.16	0.15	0.13	0.16	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15 ± 0.01	6.67

* 基金项目: 盐城市科技局研究课题资助项目(YK2012028)。

续表 2 5 份样本重复性试验结果

规格(mL)	结果($\mu\text{mol/L}$)										$\bar{x} \pm s$ ($\mu\text{mol/L}$)	CV(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
150	0.22	0.20	0.24	0.22	0.22	0.20	0.22	0.20	0.20	0.22	0.21 \pm 0.01	4.76
200	0.16	0.18	0.16	0.16	0.15	0.16	0.18	0.16	0.15	0.16	0.16 \pm 0.01	6.25
250	0.24	0.22	0.24	0.24	0.22	0.24	0.25	0.24	0.22	0.24	0.24 \pm 0.01	4.17

3 讨 论

亚甲蓝又名美蓝,是一种酚噻嗪类化合物,也是一种表面携带正电荷的光敏剂,在临床作为解毒药物用于治疗氯化物和亚硝酸盐引起的高铁血红蛋白症和抑郁症^[2]。在 MBP 法中,亚甲蓝可与带负电荷的病毒核酸的 G-C 碱基对以及病毒的脂质包膜相结合,在可见光氧化损伤的作用下,使病毒的核酸断裂,包膜破损,从而使病毒完全失去穿透、复制及感染能力,达到灭活病毒的目的^[3]。亚甲蓝作为一种外来物质进入人体后,对人体的潜在影响尚不可知,因而控制病毒灭活血浆中亚甲蓝的残留量很有必要。

本实验采用的检测波长为(654 \pm 2)nm,考虑到在此波长下,血浆蛋白的吸收度远大于残存的微量亚甲蓝的吸收度,因此不能直接采用分光光度法检测血浆中残存的微量亚甲蓝,而采用固相萃取方法。固相萃取是一种试样预处理技术,是利用固体吸附剂将样品中的目标化合物吸附,将样品的基体和干扰化合物分离,然后再用洗脱液洗脱,达到分离和富集目标化合物的目的^[4]。试验需要注意的是,配制亚甲蓝储存液时,亚甲蓝不需要烘干,因为亚甲蓝带有 3 个结晶水,易溶于水或乙醇,烘干后反而极难溶于水,溶解不充分,导致所配溶液的浓度低于预期浓度,造成检测结果偏差^[5]。

从表 1 中可以看出,血浆病毒灭活后再使用一次性病毒灭活过滤器滤除亚甲蓝,可大幅降低血浆中亚甲蓝的残留量,不同规格的血浆检测结果均小于 0.3 $\mu\text{mol/L}$,与 2012 年刚下发的《全血及成分血质量要求》(GB18469-2012)规定的标准相吻合。从表 2 中可以看出,采用本研究方法检测血浆中的亚甲蓝,稳定性好,不同规格的血浆检测 CV 值均小于 7%,平均为 5.42%。本试验所建立的方法工作流程严谨、操作性强、方法简便、适用于采供血机构质量管理部门的日常血液质量检查。

活过滤器滤除亚甲蓝,可大幅降低血浆中亚甲蓝的残留量,不同规格的血浆检测结果均小于 0.3 $\mu\text{mol/L}$,与 2012 年刚下发的《全血及成分血质量要求》(GB18469-2012)规定的标准相吻合。从表 2 中可以看出,采用本研究方法检测血浆中的亚甲蓝,稳定性好,不同规格的血浆检测 CV 值均小于 7%,平均为 5.42%。本试验所建立的方法工作流程严谨、操作性强、方法简便、适用于采供血机构质量管理部门的日常血液质量检查。

参考文献

- Wagner SJ. Virus inactivation in blood components by photoactive phenothiazine dyes[J]. Transfus Med Rev, 2002, 16(1): 61-66.
- 齐村生,任会莹,曾凤芹.病毒灭活新鲜冰冻血浆的质控指标初探[J].临床输血与检验,2009,11(3): 253-254.
- 倪小菊,郑岚,钱开诚.亚甲蓝光化学法灭活病毒的分子生物学机制[J].临床输血与检验,2007,9(1): 85-88.
- 张淑琴,温涛,赵君,等.血浆中亚甲蓝含量的检测[J].临床输血与检验,2010,12(1): 36-38.
- 杨夏,翟春燕,白旭华.病毒灭活血浆亚甲蓝含量的检测及质量控制[J].中国输血杂志,2011,24(10): 881-883.

(收稿日期:2013-05-02)

• 检验技术与方法 •

分离人外周血单个核细胞和粒细胞一步法与两步法比较*

张白杜,顾晓琼,赵明光,刘云锋,梁肖云

(广州市妇女儿童医疗中心儿童院区,广东广州 510120)

摘要:目的 比较 Ficoll 一步法和 Ficoll 两步法的体外分离效果,优化分离人外周血单个核细胞(PBMC)和粒细胞的方法和条件。方法 取 EDTA 抗凝血,分别用 Ficoll 一步法和 Ficoll 两步法分离 PBMC 和粒细胞,用血细胞分析仪进行细胞计数和分类,计算回收率和纯度,评价两种方法的分离效果。结果 一步法获得 PBMC 回收率(82.38 \pm 13.57)%、粒细胞回收率(36.22 \pm 19.46)%、PBMC 纯度(75.5 \pm 16.26)%、粒细胞纯度(58.2 \pm 27.11)%、而二步法获取 PBMC 回收率(32.93 \pm 51.81)%、粒细胞回收率(1.01 \pm 2.25)%、PBMC 纯度(42.7 \pm 45.72)%、粒细胞纯度(3.2 \pm 7.12)%。经卡方检验,Ficoll 一步法和 Ficoll 两步法的分离回收率 $\chi^2 = 21.06$,纯度 $\chi^2 = 10.892$ 两者均有统计学差异($P < 0.01$)。结论 Ficoll 一步法获得 PBMC 和粒细胞回收率和纯度明显高于 Ficoll 两步法,同时,Ficoll 一步法分离过程简单化、有利缩短工作时间、提高工作效率,与 Ficoll 两步法相比除了简化操作外,也减少了耗材,降低了试验成本,对同时分离人 PBMC 和粒细胞较适用。

关键词:粒细胞; 外周血单个核细胞; 细胞分离

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2149-02

在基础与临床医学的体外研究中,外周血单个核细胞(PBMC)和粒细胞是较常用的一类细胞。如何简易、有效地从人外周血分离出回收率和纯度较高的 PBMC 和粒细胞,是值得探讨的一个问题。传统分离人 PBMC 或粒细胞方法很多,

不同方法各有利弊^[1-5],其中 Percoll 密度梯度离心法和 Ficoll 密度梯度离心法是最常应用的分离方法。但目前尚未有报道同时分离 PBMC 和粒细胞的分离方法。为了探讨同时分离 PBMC 和粒细胞的简单有效分离方法,笔者对试剂说明书介绍

* 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(7002329)。