

血清中总巯基和非蛋白巯基的DTNB分光光度法

1 **原理** 巯基基团与5, 5'-二硫代-双-硝基苯甲酸(DTNB)反应, 形成黄色化合物。血清中的蛋白用甲醇沉淀, 离心后的上清液于412nm波长处比色测定, 用半胱氨酸作标准系列定量为总巯基含量。如先用甲醇将血清蛋白沉淀, 再与DTNB反应, 比色测定, 则为非蛋白巯基的含量。

2 仪器

- 2.1 具塞离心管, 5~10ml, 硬质玻璃。
- 2.2 台式离心机, 4000r / min。
- 2.3 可见光分光光度计(具有412nm波长)或紫外分光光度计。

3 试剂

- 3.1 DTNB溶液, 0.01mol / L无水甲醇溶液, 置于棕色小瓶中, 可使用一周。
- 3.2 Tris缓冲溶液: 称取48.4g三羟甲基氨基甲烷(Tris), 溶于1L0.02mol / L EDTANa₂溶液中, 用盐酸调pH至7.5。
- 3.3 无水甲醇。
- 3.4 巯基标准溶液(为半胱氨酸溶液): 称取26.46mg盐酸半胱氨酸(分子量174.64), 溶于50ml0.02mol / L EDTANa₂溶液中, 冷藏保存。临用时再用0.02mol / L EDTANa₂溶液稀释10倍, 相当于含巯基10 μ g / ml的标准溶液。

4 **样品的采集、运输和保存** 取1~2ml静脉血, 置于具塞离心管中, 避免溶血。低温运输和保存。

5 分析步骤

- 5.1 样品处理: 小心分离出无溶血现象的血清。
- 5.2 标准曲线的绘制: 取0.0、0.10、0.20、0.30、0.40和0.50ml标准溶液, 加0.5ml Tris缓冲液, 0.1ml DTNB溶液, 加甲醇至5.0ml; 各标准管中的巯基量分别为0.0、1.0、2.0、3.0、4.0和5.0 μ g, 放置10min后, 于412nm波长处测量吸光度。以巯基含量(μ g)对相应的吸光度绘制标准曲线。

5.3 样品测定

- 5.3.1 血清总巯基的测定: 取0.10ml血清, 置于具塞离心管中, 用测定标准系列的操作条件进行测定。由标准曲线得巯基的含量(μ g)。
- 5.3.2 血清非蛋白巯基的测定: 取0.10血清, 置于具塞离心管中, 加0.5ml Tris缓冲液, 4.3ml甲醇, 4000r / min离心, 取出上清液, 加0.1ml DTNB溶液, 放置10min后比色, 由标准曲线得巯基的含量(μ g)。

6 计算

- 6.1 血清总巯基: 按式(1)计算血清中总巯基的浓度:

$$C = \frac{m_1 - m_0}{V} \quad (1)$$

式中: C——血清中总巯基的浓度, mg / L; m₁——由标准曲线得总巯基的含量, μ g; m₀——由标准曲线得试剂空白, μ g; V——测定用的血清量, ml。

- 6.2 血清非蛋白巯基: 按式(2)计算血清中非蛋白巯基的浓度:

$$C = \frac{m_2 - m_0}{V} \quad (2)$$

式中: C——血清中非蛋白巯基的浓度, mg / L; m₂——由标准曲线得非蛋白

巯基的含量， μg ；其余同式(1)。

7 说明

7.1 本法的测定范围为 $0\sim 10\mu\text{g}$ ；相对标准偏差 $<5\%$ ；加标回收率：总巯基为 $101\%\sim 110\%$ ，非蛋白巯基为 $90\%\sim 101\%$ 。

7.2 本法测定波长与血红蛋白所形成的色素波长相同，故采血样时不能有溶血现象。

7.3 在 0.1ml 血清测定条件下，甲醇不得少于 4ml ，否则沉淀蛋白离心时会发生困难，溶液混浊，影响比色。该显色体系的 pH 值在 $6.5\sim 8.5$ 时，呈色能稳定 4h ； pH 低于 6.5 ，吸光度明显下降。

7.4 巯基化合物是指体内那些含有 $-\text{SH}$ 基团的各种有机化合物的一个统称，它在机体内担负着十分重要的解毒功能，很多种有毒重金属、砷、烯烃类、氢氰酸、醛类以及环氧化物进入体内后，都与巯基发生化学反应，大量消耗体内的巯基含量，其中以分子较小的半胱氨酸和谷胱甘肽等非蛋白巯基化合物则更为敏感。巯基反应为非特异性生化反应，在特定的职业接触可作为一种参考监测指标。

7.5 本法由北京市劳动卫生职业病防治研究所陈震阳同志研制。