

血中碳氧血红蛋白的分光光度法

1 原理 血液中含有四种血红蛋白成份，即还原血红蛋白(Hb)、氧合血红蛋白(HbO₂)、碳氧血红蛋白(HbCO)及微量的变性血红蛋白(HbMet)。用连二亚硫酸钠将HbO₂和HbMet还原成Hb，则血液中只存在HbCO和Hb两种成份。HbCO和Hb的最大吸收波长分别在420nm和430nm。测出被检血样在两个波长下的吸光度，再利用HbCO与Hb两个波长下的摩尔吸光系数计算HbCO的百分浓度。

2 仪器

2.1 采血吸管。

2.2 小玻璃管，25mm×4mm，带帽。

2.3 试管，10ml，具磨口塞，实际能盛15ml至满。

2.4 液体快速混合器。

2.5 分光光度计。

3 试剂 实验用水为蒸馏水。

3.1 硫酸。

3.2 甲酸，85% (m/m)。

3.3 连二亚硫酸钠(Na₂S₂O₄)。

3.4 氮气，高纯。

3.5 氧气，高纯。

3.6 一氧化碳纯气，钢瓶装或自制。

制备方法：在装有滴液漏斗和气体导出管的烧瓶中加入甲酸，然后缓缓滴入浓硫酸，产生的CO通过氢氧化钠洗气瓶及另一空瓶后，通入样品液中。操作应在良好的通风橱内进行。

3.7 氢氧化钠溶液，20g/L。

3.8 血液稀释液，0.02mol/L三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶液。

3.9 肝素溶液，5g/L。

4 样品的采集、运输和保存 用采血吸管取末梢血约10μl，直接注入小玻璃管中(事先加入40μl 5g/L肝素溶液)，立即加帽，旋转混匀以防凝血。应于保温瓶中加冰运输，置于冰箱冰盒内(-8℃)可保存1周。

5 分析步骤

5.1 摩尔吸光系数的测定：摩尔吸光系数不易测定，但在本法计算中，可用同一浓度的血样制得Hb及HbCO，测其在420nm及430nm下的吸光值来代替，作为常数。测定方法如下：

取不吸烟健康人血(肝素抗凝)，用水稀释5倍。取0.3ml加血液稀释液至90ml，通氧气30min。从中取4份，每份15ml于试管中；其中2份通氮气10min，以除去过剩的氧，得到HbO₂液。另两份通纯一氧化碳气10min，得到HbCO液。立即将HbO₂、HbCO制备液分别转入内盛60mg连二亚硫酸钠的试管中，混匀，放置10min后测量。读取430nm和420nm波长处的吸光度值，代替摩尔吸光系数(以下简称吸光常数)。

5.2 样品处理和测定：将冷藏的血样于室温放置，用液体快速混合器混匀。迅速取10μl(二个平行样)，加入内盛15ml血液稀释液的试管中(若采样后随即分析，可直接取10μl血放入内盛15ml血液稀释液的试管中)，加入60mg连二亚硫酸钠，轻轻混匀，放置10min。用10mm比色杯，以试剂空白为参比，测其在

420nm和430nm波长处的吸光度。

6 计算 按下式计算血中HbCO的浓度：

$$C = \frac{A_{430} \times k_2 - A_{420} \times k_4}{A_{420} (k_2 - k_4) - A_{430} (k_1 - k_3)}$$

式中：C——血中HbCO的浓度，%； A_{420} ——血样在420nm波长处的吸光度读数； A_{430} ——血样在430nm波长处的吸光度读数； k_1 ——HbCO在420nm波长处的吸光常数； k_2 ——HbCO在430nm波长处的吸光常数； k_3 ——Hb在420nm波长处的吸光常数； k_4 ——Hb在430nm波长处的吸光常数。

7 说明

7.1 本法的最低检测浓度为2% HbCO (按取10 μ l血样计)；测定范围为2%~70% HbCO；相对标准偏差为1.9%~5.6% (HbCO浓度为9.9%，36.6%，56.8%，n=6)；血样加已知浓度血测定回收率为95.8% (3个浓度，n=8)。

7.2 本法测定所依据的Hb与HbCO含量比例与血红蛋白含量高低无关，因此取血量不需要很准确。吸光度常数测定后只要仪器波长稳定，可较长时间的使用。

7.3 空气中有大量氧气，所以血样及制成的待测液接触空气越少越好。实验证明含HbCO 20%及近饱和的HbCO待测液，其容器上端空气分别为5ml~6ml及20ml时，较装满或近满者，测定结果HbCO平均下降4.5%及10.2% (n=6)。

7.4 非高纯级的钢瓶氧气和氮气含有微量的一氧化碳。制备HbO₂时应通过加热至80℃~100℃的1cm×10cm霍加拉特管除去。

7.5 连二亚硫酸钠遇水易分解，应避光密封保存，临用现称。如试剂放置过久可按下法标定：用预先盛有15ml 250g/L碱性甲醛溶液的30ml高型称量瓶，称取约1g样品 (称量至0.002g)。待样品充分溶解后移于250ml容量瓶中，加水稀释至刻度，混匀，吸出25.0ml置于锥形瓶中。加5ml 5% (V/V) 乙酸溶液，2ml 10g/L可溶性淀粉溶液，用0.05mol/L碘标准溶液滴定至蓝色为终点。计算连二亚硫酸钠的百分含量。

7.6 本法摘自上海市化工局企业标准：沪Q/HG2-001-80 (88)。