

实验一 实验室基本技术

随着临床生物化学检验理论和实验技术的发展，实验室工作者不仅要掌握本专业的相关理论和技术，而且要熟悉影响实验结果准确性的各种因素，掌握实验用纯水的制备方法与质量要求、玻璃仪器的清洗与使用、常用量器的校正与正确使用、常用仪器的检定与正确使用等实验室基本知识。

一、实验用纯水的制备与质量要求

【目的与要求】

掌握实验用纯水的制备原理、方法和用途；熟悉实验用纯水的分级和检查方法。

【原理】

水是常用的溶剂，天然水中含有许多杂质。天然水经简单的物理、化学方法处理，除去悬浮物质和部分无机盐即得到自来水。天然水和自来水经蒸馏、电渗析等处理，除去杂质，即成实验用纯水。实验用纯水并非不含任何杂质，其质量高低直接影响到所配试剂的质量，影响实验结果的准确度和精密度。

【纯水的制备方法】

1. 蒸馏法 将自来水（或天然水）在蒸馏器中加热汽化，然后冷凝水蒸汽即得蒸馏水。蒸馏水是实验室中常用的较为纯净的洗涤剂和溶剂。蒸馏法制水耗能大，冷却水消耗亦多，同时需注意管道的清洁。蒸馏水在 25°C 时其电阻率为 $1 \times 10^5 \Omega/\text{cm}$ 左右。

2. 离子交换法 它是将自来水通过离子交换柱（内装阴、阳离子交换树脂）除去水中杂质离子的方法。

离子交换树脂是一种人工合成的带有交换活性基团的多孔网状结构的高分子化合物，在网状结构的骨架上，含有许多可与溶液中的离子起交换作用的“活性基团”。根据树脂可交换活性基团的不同，离子交换树脂被分为阳离子交换树脂和阴离子交换树脂两大类。

当水通过阳离子交换树脂时，水中的 Na^+ 、 Ca^{2+} 等阳离子与树脂中的活性基团 $-\text{H}^+$ 发生交换；当水通过阴离子交换树脂时，水中的 Cl^- 、 SO_4^{2-} 等阴离子与树脂中的活性基团 $-\text{OH}^-$ 发生交换。所以离子交换法制备纯水时的过程是水中的杂质离子先通过扩散进入树脂颗粒内部，再与树脂的活性基团中的 H^+ 和 OH^- 发生交换的过程。

由于树脂是多孔网状结构，具有很强的吸附能力，可以同时除去电中性杂质，又因交换柱本身是一个很好的过滤器，所以颗粒杂质可以一同除去。本法得到的去离子水纯度较

高, 25℃时电阻率达 $5 \times 10^6 \Omega/\text{cm}$ 以上。

3 电渗透法 电渗透法是将自来水通过电渗析器, 除去水中阴、阳离子, 实现净化的方法。电渗析器主要由离子交换膜、隔板、电极等组成。离子交换膜是整个电渗析器的关键部分, 是由具有离子交换性能的高分子材料制成的薄膜。阳离子交换膜(阳膜)只允许阳离子通过, 阴离子交换膜(阴膜)只允许阴离子通过。电渗析水的电阻率一般在 $10^4 \sim 10^5 \Omega/\text{cm}$ 。

4. 炭吸附法 炭吸附法是采用装有活性炭柱处理自来水, 除去有机物的方法。该法可作为各种制备纯水配套的一种措施。

5. 超滤膜法 超滤膜法是采用超滤膜除去供水中的悬浮物的方法, 所得的水需进一步纯化。

6 混合纯化系统 目前多采用本法制备纯水, 其基本装置系用滤膜预处理系统的供水、结合炭吸附和离子交换处理, 最后以孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 的滤膜除去微生物。

【水的纯度检查】

水的纯度检查首先用电导率仪测定其电导率或电阻率, 然后用特定试剂检测水中可溶性硅、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 等成分的含量。

1. 电阻率 用电导仪或兆欧表测定。用电导仪测得电导率, 与电阻率可进行换算。电导是电阻的倒数, 单位为西门子(S), 即 $1\text{S} = 1\Omega^{-1}$; 每厘米长的电导为电导率(S/cm)。电导仪表头读数单位为 $\mu\text{S}/\text{cm}$, $1\mu\text{S}/\text{cm} = 1 \times 10^{-6}\text{S}/\text{cm}$, 即当电导仪读数为1时, 其电阻率为 $1 \times 10^6 \Omega$ ($1\text{M}\Omega$)/cm。

2. 可溶性硅定性检验 方法如下: 纯水 10ml 加入 1% 的钼酸溶液 15 滴, 草酸硫酸混合液(4% 草酸 1 份加 4mol/L H_2SO_4 3 份) 8 滴, 摇匀, 置室温 10min, 滴加 1% 硫酸亚铁溶液 5 滴摇匀, 以不显蓝色为合格 ($\leq 0.05\text{mg/L}$)。

【实验用纯水标准】

美国病理学会(CAP)于1976年提出了实验用水的三级标准, 见表1-1。美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)于1985年提出了新标准, 见表1-2。

表 1-1 CAP 生化试剂及生化检验用水标准

特性指标	I 级	II 级	III 级
pH	6.0 ~ 7.0	6.0 ~ 7.0	6.0 ~ 7.0
电导率 ($\mu\text{S}/\text{cm}$, 25℃)	<0.1	<2.0	<5.0
电阻率 ($\text{M}\Omega/\text{cm}$, 25℃)	>10	>0.5	>0.2
硅酸盐 (mg/L)	<0.01	<0.01	<0.01
重金属 (mg/L)	<0.01	<0.01	<0.01

表 1-2 美国 NCCLS 等级纯水的规定

级 别	I 级	II 级	III 级
微生物含量 (最大每毫升菌落)	10	10^3	未定
pH	未定	未定	5.0 ~ 8.0

续表

级 别	I 级	II 级	III 级
电阻率 ($M\Omega/cm$, $25^{\circ}C$)	10	2.0	1.0
硅 ($mgSiO_2/L$, 最大量)	0.05	0.1	1.0
微粒	$0.2\mu m$ 微孔膜过滤	未定	未定
有机物质	活性炭过滤	未定	未定

【实验用纯水的使用与用途】

临床实验室一般选用 II 级水, 特殊实验如酶活性测定、电解质分析等应选用 I 级水, III 级水用作仪器、器皿的自来水清洁后冲洗。实验用纯水用途见表 1-3。

表 1-3 NCCLS、CAP 规定的等级纯水的用途

级 别	用 途
NCCLS	I 原子吸收、火焰光度、电解质、荧光、酶、高灵敏度层析、电泳、参比液、缓冲液
	II 一般实验检验, 玻璃器皿冲洗
	III 玻璃器皿洗涤, 要求不高的定性试验
CAP	I 原子吸收、火焰光度、酶、血气及 pH、电解质、无机元素、缓冲液、参比液
	II 一般实验室检验, 血液学、血清、微生物检验等
	III 普通定性测定、尿液检验、组织切片、寄生虫、器皿洗涤

在实际工作中, 还应重视纯水的贮存、运输和使用过程, 防止使纯水等级下降。一般选用聚乙烯或聚丙烯桶(瓶)贮存, 贮存时间不宜太长。使用时应避免一切可能的污染, 切勿用手接触纯水或容器内壁。

【思考题】

1. 实验用纯水常用的制备方法有哪些? 各有何优缺点?
2. 如何根据实验项目来合理选择不同级别的实验用水?

二、实验用玻璃仪器的清洗、使用和校正

【目的与要求】

掌握普通玻璃仪器的正确清洗和使用方法; 熟悉吸量管、容量瓶的校正方法; 了解清洁液的配制和使用。

【实验用玻璃仪器的分类】

实验用玻璃仪器分为容器类和量器类。容器类玻璃仪器为常温或加热条件下, 物质的反应容器和贮存容器, 包括试管、烧杯、锥形瓶、滴瓶、漏斗等。量器类玻璃仪器用于计量溶液体积, 不可用作实验容器, 包括量筒、移液管、吸量管、容量瓶、滴定管等。

【普通玻璃仪器的使用】

1. 量筒 量筒是实验中常用的度量液体的量器，用于不太精密的液体计量，用容量表示。根据需要选用各种不同容量规格的量筒。例如量取 8.0ml 液体时，应选用 10ml 量筒（测量误差为 $\pm 0.1\text{ml}$ ）如果选用 100ml 量筒量取 8.0ml 液体体积，则至少有 $\pm 1\text{ml}$ 的误差。

量筒不能用作反应容器，不能装热的液体，更不可对其加热。

读取量筒的刻度值，一定要使视线与量筒内液面（半月形弯曲面）的最低点处于同一水平线上，否则会增加体积的测量误差。

2. 容量瓶 容量瓶是一种细颈梨形的平底瓶，瓶颈上有环形标线，表示在所指温度下（一般为 20°C ）液体充满至标线时的容积。常用的容量瓶有 25ml、50ml、100ml、250ml、500ml、1 000ml 等规格。

容量瓶主要是用于把精密称量的物质配制成准确浓度的溶液或是将准确容积及浓度的浓溶液稀释成准确浓度及容积的稀溶液。

容量瓶与瓶塞要配套使用，使用前应检查是否漏水。工作中不要一次性地将溶液加至刻度。不宜用容量瓶长期存放溶液。另外，容量瓶不能在烘箱中烘烤，不许以任何形式对其加热。

3. 移液管、吸量管 移液管和吸量管是用于准确量取一定体积液体的量出式的玻璃量器。移液管的中间有一膨大的球部，球部上、下均为细窄的管颈，上端管颈刻有一条标线，用于移取固定量的溶液。吸量管是具有分刻度的玻璃管，亦称刻度吸量管，用于移取非固定量的溶液。

用移液管（吸量管）移取溶液前，应保证其干燥清洁，并用欲移取的溶液涮洗 2~3 次，以确保所移取溶液的浓度不变。移取溶液时，用右手的大拇指和中指拿住管上方，下端插入溶液中 1~2cm，左手用洗耳球慢慢将溶液吸入管内。当液面升高到刻度以上时，立即用右手的示（食）指按住管口，将移液管（吸量管）下口提出液面，管的末端靠在盛溶液器皿的内壁上，略为放松示指，使液面平稳下降，直到溶液的弯月面与标线相切时，立即用示指压紧管口，使液体不再流出。取出移液管（吸量管），以干净滤纸片擦去移液管（吸量管）末端外部的溶液，然后插入承接溶液的器皿中，使管的末端靠在器皿内壁上。此时移液管（吸量管）应垂直，承接的器皿倾斜，松开示指，让管内溶液自然地沿器壁流下，加入所需量溶液，等待 10~15s 后，拿出移液管（吸量管）。管口上未标“吹”字，残留在移液管（吸量管）末端的溶液，不可用外力使其流出；管口上刻有“吹”字，使用时末端的溶液必须吹出。

4. 试管 口径一般为 10~15mm，常用规格为 10mm×75mm、13mm×100mm、15mm×150mm 等，用玻璃或塑料制成。试管规格和质量的选择按试验而定。临床实验室宜使用化学清洁、一次性试管，以保证试验的质量。

5. 烧杯 用于盛液、加热、溶解和配试剂，常与容量瓶配合使用。使用时切勿用手接触其内壁，溶解或混匀试剂时可用玻璃棒搅拌助溶或助匀。烧杯内试剂倾入容量瓶时，注意多次冲洗烧杯，一并倾入容量瓶内。

6. 漏斗 漏斗都呈 60° 角，下部直管有长有短。在定量分析中，漏斗垫滤纸过滤时，滤纸对角折叠两次后放入漏斗内，纸的边缘不能超出漏斗上缘，滤纸的大小要与欲过滤液量相配，过大会使滤液收量减少、所含成分浓缩从而影响试验的结果。

【普通玻璃仪器的清洗】

实验中所使用的玻璃仪器清洁与否，直接影响实验结果。如果仪器不清洁或被污染将会造成较大的实验误差，甚至会出现相反的实验结果。因此，玻璃仪器的洗涤清洁是一项非常重要的工作。

1. 初用玻璃仪器的清洗 新的玻璃仪器表面常附着有游离的碱性物质，可先用肥皂水（或去污粉）洗刷再用自来水洗净，然后浸泡在 $1\% \sim 2\%$ 盐酸溶液中过夜（不少于 4h），再用自来水冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~3 次，在 $100 \sim 130^\circ\text{C}$ 烘箱内烤干备用。

2. 使用过的玻璃仪器的清洗

(1) 容器类玻璃仪器 如试管、烧杯、锥形瓶等。先用自来水洗刷至无污物，再选用大小合适的毛刷沾取去污粉（掺入肥皂粉）刷洗或浸入肥皂水内。将器皿内外（特别是内壁）细心刷洗，用自来水冲洗干净后，再用蒸馏水冲洗 2~3 次，烤干或倒置在清洁处，干后备用。

(2) 量器类玻璃仪器 如吸量管、滴定管、容量瓶等。使用后应立即浸泡于凉水中，勿使物质干涸；然后用流水冲洗，除去附着的试剂、蛋白质等物质。晾干后浸泡在铬酸洗液中 4~6h（或过夜），再用自来水充分冲洗，最后用蒸馏水冲洗 2~4 次，晾干备用。

(3) 其他 具有传染性标本的容器，如病毒、传染病患者的血清等沾污过的容器，应浸泡在杀菌剂（ 5% 煤酚皂溶液）中过夜，进行消毒后再清洗。

【清洁液的配制和使用】

清洁液的配方有数种（表 1-4），可按需要选用。

表 1-4 清洁液的配方

配 方	1	2	3
重铬酸钾 (g)	80	50	200
粗浓硫酸 (ml)	100	900	500
水 (ml)	1000	100	500

配制时，先将重铬酸钾溶于水，加热助溶，待冷。然后将粗浓硫酸缓慢加入上液中，边加边搅拌，切勿过快，以免产生高热使容器破裂。不要把重铬酸钾溶液向硫酸中倾倒。配制时，根据用量选用烧杯或陶瓷缸作容器。

清洁液的腐蚀性强，用时注意勿溅在皮肤和衣服上。它的吸水性较强，故应加盖贮存。如果清洁液的颜色逐渐变为绿色，表示效力降低，再加入适量的重铬酸钾和浓硫酸，还可继续使用；如已变成黑色，则不能再使用。

清洁液适用于事先清洗过但未能洗净的玻璃器皿，将水甩干后浸泡。未清洗或未消毒

的器皿不要直接浸泡于清洁液中，否则会使清洁液迅速失效，减低洗涤能力。

【常用玻璃量器的校正】

在校正量器之前，必须先熟悉玻璃容量仪器的正确使用方法，校正时的使用方法必须和实际工作中的使用方法一致。

校正量器的方法是从量器在某温度时所容纳的水或水银重量，来推算其体积。由于量器的容积随温度而变化，所以必须确定温度，量器才有其意义。温度的选择以接近实验室全年平均温度为佳，一般采用 20℃。例如，20℃ 1000ml 的容量瓶，是指在 20℃时，它的容积为 1000ml；如果温度超过 20℃，显然它的容积大于 1000ml；低于 20℃，它的容积就不足 1000ml。因此，校正时必须考虑三个因素：①温度对容量仪器的影响；②温度对水（或水银）密度的影响；③空气浮力对所称水（或水银）重量的影响。其中影响最大的是温度对水密度的影响，校正时的温度应尽可能选择靠近 20℃。

进行容量校正时，先称量出量器某温度下某一容量标线内容纳或放出的水重，然后根据下式将该温度下水的重量换算为 20℃时的体积。

$$V_{20} = W_t / r$$

式中 W_t 为某一温度下所称得的水重

r 表示在 20℃时充满容量为 1L 的玻璃量器的水，在空气中不同温度下用黄铜砝码所称得的重量（表 1-5）

表 1-5 水在 10~40℃间的 r 值

t (°C)	r (g)	t (°C)	r (g)
10	998.14	26	995.91
11	998.34	27	995.66
12	998.26	28	995.41
13	998.17	29	995.51
14	998.06	30	884.88
15	997.94	31	994.60
16	997.81	32	994.31
17	997.67	33	994.01
18	997.51	34	993.71
19	997.35	35	993.40
20	997.15	36	993.07
21	996.99	37	992.74
22	996.79	38	992.41
23	996.59	39	992.06
24	996.37	40	991.71
25	996.14		

例如：容器为 1L 的量瓶在 21℃校正时，称得水重为 998.06g，从表 1-5 查得 21℃时

r 值为 996.99g，则该量瓶在 20℃ 时的真实容量为

$$V_{20} = \frac{W_t}{r} = \frac{998.06}{996.99} \times 1000 = 1001.07 \text{ (ml)}$$

校正值为 $1001.07 - 1000 = +1.07\text{ml}$

这种校正方法考虑了影响玻璃量器容量的三个因素，校正结果精密准确，适用于准确度较高的分析工作。

1. 吸量管的校正 校正吸量管时应事先洗净、干燥。一般 0.2ml 以上吸量管均可用水称量法校正。取 25ml 或 50ml 具塞锥形瓶一只，于分析天平上精确称重。加水后的重量减去原瓶重即得 W_t ，代入公式求得 V_{20} 值。如果在允许误差范围内即为合格，超出允许误差范围者则弃去不用或重新刻度。

2. 容量瓶的校正 容量瓶为量入式量器。校正时将已清洗干燥的容量瓶置天平上称重，然后向容量瓶中注入蒸馏水至刻度，用滤纸吸去瓶颈内壁上沾附的水珠再称量，此重量减去空瓶重即为 W_t ，代入公式即可求出 V_{20} 。

【思考题】

1. 玻璃仪器的洗涤清洁对实验结果有何影响？如何根据实际情况进行玻璃仪器的洗涤清洁？
2. 吸量管校正时应考虑哪些影响因素？如何进行校正？

三、加样器的使用与校正

【目的与要求】

掌握加样器的正确使用方法；熟悉加样器的校正过程。

【加样器的使用】

加样器下段为可装卸可更换的吸液嘴，用加样器上方的“推进按钮”定量采取液体。它有固定式和可调式两种。

在使用加样器时，如为可调式则先将容量调至所需容量上，在下端装上吸液嘴，右手握住加样器，用拇指把“推进按钮”向下按到第一静止点（第一档位），将吸液嘴尖头浸入样品或溶液中 1~3mm 深度，再缓缓放开“推进按钮”，使返回原处，停留 1~2s 后，将吸液嘴离开标本或溶液，拭干吸液嘴外部残液。然后把吸液嘴尖头轻轻地接触容器内壁，将“推进按钮”向下按到第一静止点（第一档位），停留 1~2s，再将“推进按钮”向下按到第二静止点（第二档位），排出尖头中的残液。

【注意事项】

1. 加样器是精密量器，不允许将加样器直接与液体接触，以免液体或杂质吸入管内，导致阻塞。吸液嘴与吸液杆的连接必须密合。

2. 吸液嘴在使用前须经湿化,即在正式吸液前将所吸溶液吸放 2~3 次。湿化前后实际容量和排出量均有显著差异。另外,有些新购的吸液嘴是经硅化过的,这有利于减少液体的吸附,但有实验表明,经加样—浸泡—消毒—冲洗—烘干备用连续使用 1 周后,其泄出量即显著降低,有条件应予以重新硅化,对外观有明显“花纹”或透明度降低者应弃掉不用。

3. 当加样器中有溶液时,不得倒放,必须垂直放置,否则久后失准。

【加样器的校正】

目前,许多实验室都已经使用国产或进口的加样器,尽管进口加样器在准确度、精密度、性能和使用寿命等方面优于国产加样器,但在这类量器的使用中,每年至少也应检验校正 2~3 次,校正方法如下:校正时要求室温 20℃,按正规操作吸取蒸馏水,并精确称取蒸馏水重量,计算出容积及校正值。如果相对百分误差大于 $\pm 2\%$ 时,应进行调整。调整后,必须再进行检测,直至加样器能正确给出调整的容积

【思考题】

如何正确使用加样器?使用时应注意哪些方面?

四、分光光度计的光源检查和波长校正

【目的与要求】

掌握分光光度计的光源检查和波长校正方法。

【光源检查】

光源检查即波长初步检查:不论何种分光光度计在校正之前都要先检查光源。检查方法是将波长选定在 580nm 处,将狭缝开到最大(或打开光门),打开钨灯,在比色皿内插一片白纸片。当光源正常时,应看到均匀的黄色光斑,边缘清晰整齐;如果明暗不均,形状异常,则应调节光源灯的位置。调节方法是放松灯座固定螺丝,一边小心地向各个方向移动灯的位置,一边观察光斑变化,直至出现明亮均匀的黄色光斑为止。如系 751 型或高级分光光度计,这种调试工作还因灯泡固定机构复杂而应更细致,调好后要固定好。每次换新灯泡时都需要重新调整。

【波长校正】

分光光度计的波长精度随不同类型而异,且受温度影响,故常常需要对波长进行校正,即检查波长刻度与实际波长之差是否保持在一定的范围内,否则将使测定的误差增大。波长校正的方法很多,常用的有:①用含某些特定元素的玻璃来校正。最常用的有锆钡玻璃、钡玻璃等。校正时将这种玻璃放在比色皿座上,以空气调零,测定几个吸收峰值的波长是否相符即可。最常用的为 573nm 与 586nm 的双峰和 741nm、808nm 等处,如与刻度不符,需要时应调节准直镜角度进行校正。一般可见分光光度计波长精度只有 $\pm 3 \sim \pm 4\text{nm}$,在此范围内一般可不调

整。②可利用某些标准溶液进行校正，如标准重铬酸钾溶液（在 1000ml 0.05mol/L 的 KOH 中溶解 0.0400g 纯 K_2CrO_4 ），在 25℃ 以 1cm 比色皿在各波长测定其标准吸光度，如表 1-6。重铬酸钾溶液的优点是在紫外区 270nm 及 370nm 处有两个最大吸收。也可用硫酸钴铵 $[CoSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O]$ 的 0.0366mol/L 溶液（每升中含 14.46g），此溶液在 510nm 有最大吸收，其标准吸光度值为 0.174。

表 1-6 标准 K_2CrO_4 在不同波长的标准吸光度值

波长(nm)	吸光度(A)	波长(nm)	吸光度(A)	波长(nm)	吸光度(A)	波长(nm)	吸光度(A)	波长(nm)	吸光度(A)
220	0.4559	280	0.7235	340	0.3143	400	0.3872	460	0.0173
230	0.1675	290	0.4295	350	0.5528	410	0.1972	470	0.0083
240	0.2933	300	0.1518	360	0.8297	420	0.1261	480	0.0035
250	0.4962	310	0.0458	370	0.9914	430	0.0841	490	0.0009
260	0.6345	320	0.0620	380	0.9281	440	0.0535	500	0.0000
270	0.7447	330	0.1457	390	0.6841	450	0.0325		

【思考题】

为什么要进行分光光度计的波长校正？如何进行分光光度计的波长校正？

五、试剂与试剂的配制

【目的与要求】

掌握试剂的使用原则；熟悉试剂配制的方法；了解化学试剂的规格和选用原则。

【化学试剂的品级规格】

化学试剂有不同的品级规格，如果在实验中选用了低品级的试剂，一般而言会引入一个恒定的系统误差，有时会因误差太大导致实验失败。但盲目地选择高品级试剂，则导致不必要的浪费。临床化学实验中，使用目的不同对化学试剂的质量要求也不同，检验工作者应熟悉化学试剂的品级规格及其用途，以便根据不同的使用目的正确选用。

我国参照进口化学试剂的质量标准，对通用试剂制定四种常用规格。即一级 G. R. (guarantee reagent) 保证试剂；二级 A. R. (analytical reagent) 分析纯试剂；三级 C. P. (chemical pure) 化学纯；四级 L. R. (laboratory reagent) 实验试剂。化学试剂的品级、纯度和用途见表 1-7。

表 1-7 一般化学试剂的品级、纯度和用途

品 级	一级试剂	二级试剂	三级试剂	四级试剂
国内标准	优级纯（保证试剂） CR	分析纯（分析试剂） AR	化学纯 CP	实验试剂 LR

续表

品 级	一级试剂	二级试剂	三级试剂	四级试剂
	绿色标签	红色标签	蓝色标签	黄色标签
国外标准	AR	CP	LAP	
	GR	PUSS	EP	X
	ACS	PURISS		
	PA			
	纯度高、杂质含量低，适用于研究和配制标准液	纯度较高、杂质含量较低，适于定性和定量分析	质量略低于二级试剂，用途近二级试剂	纯度较低，用于一般定性试验

【化学试剂的选用】

1. 选用原则 应根据检验方法的要求及样品含量来决定。干扰因素较多、含微量物质的样品测定时，必须选用品级、纯度较高试剂，如微量元素测定必须用优级纯，其标准物须用光谱纯度试剂；作为标准物的试剂须选用品级高的试剂；一般的定性检验可选用实验试剂。一般来说，试剂纯度越高，试剂引起的误差就越小。但也不要过分强求这一点，否则会造成经济上不必要的损失或影响工作。总之，应把试剂的选用标准和要求同方法的精密度和灵敏度结合起来加以选用。

2. 核对瓶签 所用试剂须有瓶签，应核对品级、纯度、含有成分的百分率和不纯物（杂质）的最高数据及化学分子式。

3. 观察试剂性状有无变质 有些化合物本身不稳定，经过长期贮存亦能逐渐发生分解、氧化、还原、聚合、升华、蒸发、沉淀析出等变化。一旦出现混浊、沉淀、颜色改变等一般不再使用，应弃之。但有的可重新蒸馏纯化后再用。

【试剂配制与使用原则】

根据情况及实际需要不同，试剂的配制分为两大类：一是直接配制法，适用于标准溶液和一般溶液配制；二是间接配制法，适用于不易恒重的固体试剂和含量不准的液体试剂，即先配出大约浓度的溶液，再用标准溶液标定出准确的浓度，如酸碱溶液、 KMnO_4 溶液、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液的配制即用间接法。试剂配制在医学检验工作中是非常重要的工作之一，一切检验结果的准确性，必须有试剂的质量保证。因此，对实验室工作中的试剂配制与管理，应有一定的要求和使用的原则。

1. 登记 建立试剂登记与双查双签制度。配制者应在试剂登记簿上登记配制试剂处方，处方应体现原试剂级别、浓度、pH、加入先后顺序、配制方法及配制总量等，要求计算准确，固体试剂和液体试剂应以瓶签所注明的化学式、比重和百分数作为计算组成量的依据。配制总量应根据其工作量与试剂保存期限来确定。最后由另一人核对并双人签名。

2. 试剂恒重 部分化学试剂在存放过程中会吸收空气中的水分，如果直接称量配制，显然是不准确的。用适当的方法除去吸收的水分，使试剂恢复到吸潮前的状态，这一过程称为恒重。需要恒重的试剂在使用前必须进行恒重，但各种试剂的恒重方法不尽相同。

3. 试剂的纯化与称重 部分试剂在贮存过程中会发生氧化（如邻甲苯胺、胆红素

等)、分解(如丙烯酰胺等)、聚合(如甲叉双丙烯酰胺)等反应,使其变得不符合使用要求,有些则因本身纯度不够,因而在使用前需对这些试剂进行一定的处理,使其纯度满足需要,此过程称为纯化。

试剂的称重是决定所配试剂浓度准确与否的关键一环,称重必须准确。一般固体试剂称取,应用称量瓶、玻璃纸等盛试剂,以便冲洗。一般不用纸盛试剂,尤其是粗糙的纸。对易潮解、易挥发的试剂称量应迅速。标准物须用万分之一天平称取。

4. 溶剂 试剂配制中的溶剂一般为蒸馏水,特殊试剂或非水为溶剂的试剂应注明清楚。蒸馏水的水质即外观、pH、氯化物及硫酸盐等指标必须符合规定。配制一些特殊要求的试剂,所用的蒸馏水还须作特殊处理,如微量元素测定用水,必须经双重蒸馏,血氮测定要用无氨蒸馏水。

试剂配好后要在试剂瓶上写明名称、浓度、配制时间,必要时可注明用途、用量。

5. 试剂的保管 为保证试剂质量,延长试剂有效期限,科学存放试剂至关重要。妥善保管试剂具有两方面的含义,一是保证安全,如剧毒、麻醉、易燃、易爆、腐蚀品等的保管;二是保证质量,防止变质。保证安全主要在于加强责任心,而保证质量,防止变质主要有如下措施:①分类按顺序存放,贮于干燥冷暗处;②严密封盖,必要时加蜡封口;③需冷藏保存的试剂并非温度越低越好,应根据瓶签上标示的贮存温度分别置冰箱、冰盒或低温冰箱中;④强酸、强碱应分别存放。

【思考题】

1. 通用化学试剂有哪几种规格?如何选用?
2. 实验用水有哪几种?临床生化检验实验用水有何要求?

(姜旭淦)

实验二 血清蛋白质测定

蛋白质是构成人体的主要组成成分，血浆蛋白质是血浆固体成分中含量最多、组成复杂、功能广泛的一类化合物。在临床化学检验中，血浆总蛋白及其组分蛋白测定，对临床疾病的诊断、治疗和预后具有重要价值。

一、血清总蛋白测定（双缩脲比色法）

【目的与要求】

掌握双缩脲比色法测定血清总蛋白的原理和方法，分光光度计的使用方法和日常维护；熟悉血清总蛋白各种测定方法的原理和优缺点；了解双缩脲试剂的概念和配制要求。

【原理】

血清（浆）中蛋白质的肽键（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）在碱性溶液中能与 2 价铜离子作用生成稳定的紫红色络合物。此反应和两个尿素分子缩合后生成的双缩脲（ $\text{H}_2\text{N}-\text{OC}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ）在碱性溶液中与铜离子作用形成紫红色的反应相似，故称之为双缩脲反应。这种紫红色络合物在 540nm 处的吸光度与血清蛋白质含量在一定范围内呈正比，经与同样处理的蛋白质标准液比较，即可求得蛋白质含量。

【试剂】

1. 6 mol/L NaOH 溶液 称取 NaOH 240g，溶于新鲜制备的蒸馏水（或刚煮沸冷却的去离子水）约 800ml 中，冷却后定容至 1L，贮于有盖塑料瓶中。若用非新开瓶的 NaOH，须先配成饱和溶液，静置 2 周左右，使碳酸盐沉淀，其上清饱和 NaOH 溶液经滴定后，算出准确浓度再使用。

2. 双缩脲试剂 称取硫酸铜结晶（ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ）3g 溶于新鲜制备的蒸馏水（或刚煮沸冷却的去离子水）500ml 中，加入酒石酸钾钠（ $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ）9g 和 KI 5g，待完全溶解后，在搅拌下加入 6mol/L NaOH 溶液 100ml，并用蒸馏水定容至 1L。若贮存瓶中有黑色沉淀出现，则需要重新配制。

3. 双缩脲空白试剂 除不含硫酸铜外，其余成分与双缩脲试剂相同，置聚乙烯瓶中密封保存。

4. 60 ~ 70g/L 蛋白质标准液 常用牛血清白蛋白作标准或收集混合血清（无黄疸、无溶血、乙型肝炎表面抗原阴性、肝肾功能正常人的血清）经凯氏定氮法定值后作标准。定值质控血清不能用作血清总蛋白测定的标准物。

【操作步骤】

1. 生化自动分析仪法 按试剂盒说明书或附录提供的参数进行操作。
2. 手工操作法 取试管 3 支，标明空白管（B）、标准管（S）、测定管（U），按表 2-1 操作。

表 2-1 双缩脲法测定血清总蛋白操作步骤

加入物（ml）	B	S	U
血清	—	—	0.10
蛋白质标准液	—	0.10	—
蒸馏水	0.10	—	—
双缩脲试剂	5.0	5.0	5.0

混匀，置 25℃30min 或 37℃10min，在波长 540nm 处比色，用蒸馏水调零，测各管吸光度。

【计算结果】

$$\text{血清总蛋白 (g/L)} = \frac{\text{测定管 (或校正) 吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{蛋白标准液浓度 (g/L)}$$

参考范围 60 ~ 80g/L。

【注意事项】

1. 测定的血清以新鲜为宜，但在冰箱保存而不混浊的标本也可应用，高脂血症混浊血清会干扰比色，可采用下述方法消除：取 2 支带塞试管或离心管，各加待测血清 0.1ml，再加蒸馏水 0.5ml 和丙酮 10ml，塞紧并颠倒混匀 10 次后离心，倾去上清液，将试管倒立于滤纸上吸去残余液体。向沉淀中分别加入双缩脲试剂及双缩脲空白试剂，再进行与上述相同的其他操作和计算。
2. 胆红素和血红蛋白本身的颜色可引起吸光值增加，造成阳性干扰，但经样品空白校正后可忽略不计。由于血红蛋白本身能与双缩脲试剂反应，产生与血清白蛋白和球蛋白相近的显色效价，故应注意高血红蛋白的影响。
3. 葡萄糖、酚酞、溴磺酞钠及右旋糖酐对本法有明显干扰。
4. 蛋白质与双缩脲试剂反应生成紫红色络合物的吸光度与试剂的组分、pH、反应温度以及蛋白质的性质有关，所以在做蛋白质标化测定时，实验仪器的技术状态和反应条件等都必须严格加以控制。

【方法学评价】

蛋白质测定方法很多，常用的有化学法、物理法和染料结合法等。

化学法包括凯氏定氮法，这是一个用于测定生物物质中总氮含量的方法，其准确度高、精密度好，成为测定蛋白质最经典的标准方法，但由于其测定手续繁琐，除用作血清

蛋白质标准品定值及参考性测定工作外，现已很少在血清总蛋白测定中使用；酚试剂法灵敏度较高，可用于测定脑脊液和尿液中的微量蛋白质，但由于该法是先测定出酪氨酸的量，再根据酪氨酸在蛋白质中含量而得出蛋白质的含量，因而准确度较差；双缩脲法是测定蛋白质最古老的方法之一，此反应的优点是对白、球蛋白产生的颜色反应相近，干扰物质少，且不受温度影响，惟一的缺点是灵敏度较低，比酚试剂法低约 100 倍。但本法的检出限为 $0.2 \sim 1.7 \text{ g/L}$ ，这相当于 70 g/L 的血清 $3 \sim 24 \mu\text{l}$ ，已能满足临床生化检验的需要。

物理法又可分为紫外吸收法、折射法和重量法等。除紫外吸收法外，其他方法现已很少使用或被淘汰。

蛋白质与染料结合的方法测定蛋白质是比较灵敏而特异的一类方法。用的较多的染料有丽春红、考马斯亮蓝 G250 和邻苯三酚红钼。丽春红蛋白结合法测得的结果与凯氏定氮法相符，并且显色后在室温可稳定 24h；考马斯亮蓝 G250 结合蛋白法灵敏度高，特异性强，操作简便，广泛用于尿蛋白，脑脊液蛋白及各种微量蛋白的检测，但该方法测定蛋白浓度的线性范围不宽，与白、球蛋白反应的灵敏度不同，反应强度亦受温度的影响，且比色杯吸附色素而干扰测定，不能用于自动化分析仪，因此该法的应用受到了一定的限制；邻苯三酚红钼络合显色法克服了考马斯亮蓝 G250 结合蛋白法的上述缺点，且具有简便、稳定等优点，可用于自动化分析仪。

【思考题】

1. 什么叫双缩脲试剂？为什么要在双缩脲试剂中加入酒石酸钾钠和碘化钾？
2. 阐述双缩脲比色法测定血清总蛋白的原理和方法。
3. 阐述分光光度计的使用方法和日常维护。
4. 比较血清总蛋白各种测定方法的原理和优缺点。

二、血清白蛋白测定（溴甲酚绿法）

【目的与要求】

掌握溴甲酚绿法测定血清白蛋白的原理和方法及影响因素、条件控制；熟悉微量加样的基本技能；了解血清白蛋白各种测定方法的优缺点。

【原理】

血清白蛋白在 pH4.2 的缓冲液中带正电荷，在有非离子型表面活性剂存在时，可与带负电荷的染料溴甲酚绿（bromocresol green, BCG）结合形成蓝绿色复合物，其颜色深浅与白蛋白浓度成正比，与同样处理的白蛋白标准液比较，可求得血清中白蛋白含量。

【试剂】

1. 0.5 mol/L 琥珀酸缓冲贮存液（pH4.0） 称取 NaOH 10g 和琥珀酸 56g，溶于蒸馏水 800ml 中，用 1 mol/L NaOH 溶液调至 $\text{pH}4.1 \pm 0.05$ 后，加蒸馏水定容至 1L。置 4°C 冰

箱保存。

2. 10mmol/L BCG 贮存液 称取 BCG (MW = 720.02) 1.80g 溶于 1mol/L NaOH 溶液 5ml 中，加蒸馏水至 250ml。

3. 叠氮钠贮存液 称取叠氮钠 4.0g 溶于蒸馏水中，配成 100ml 溶液。

4. 聚氧化乙烯月桂醚 (Brij-35) 贮存液 称取 Brij-35 25g 溶于蒸馏水约 80ml 中，加温助溶，冷却后加蒸馏水至 100ml。室温可稳定 1 年。

5. BCG 试剂 在 1L 容量瓶内加蒸馏水约 400ml，琥珀酸缓冲贮存液 100ml，用吸管准确加入 BCG 贮存液 8.0ml，并用蒸馏水冲洗吸管壁上残留的染料，加叠氮钠贮存液 2.5ml、Brij-35 贮存液 2.5ml，最后加蒸馏水至刻度，混匀。此溶液 pH 应为 4.15 ± 0.05 ，盛于加塞的聚乙烯瓶内。在室温保存可稳定半年。

6. 60g/L 白蛋白标准液 称取人血清白蛋白 6g、叠氮钠 50mg，溶于蒸馏水中并缓慢搅拌助溶，配成 100ml。密封贮存于 4℃ 冰箱，可稳定半年。也可用定值参考血清白蛋白标准。

【操作步骤】

1. 生化自动分析仪法 按试剂盒说明书或附录提供的参数进行操作。

2. 手工操作法 取试管 3 支，标明空白管 (B)、标准管 (S)、测定管 (U)，按表 2-2 操作。

表 2-2 BCG 法测定白蛋白操作步骤

加入物 (ml)	空白管	标准管	测定管
血清	—	—	0.02
白蛋白标准液	—	0.02	—
蒸馏水	0.02	—	—
BCG 试剂	4.0	4.0	4.0

在波长 630nm 处用空白管调零，用微量加样器加 BCG 试剂，与测定管血清混合后，立即在 $30 \pm 3s$ 内读取吸光度。

如标本因严重高脂血症而混浊，需加做标本空白管 (取血清 0.02ml，加入琥珀酸缓冲贮存液 4.0ml)，用琥珀酸缓冲贮存液调零，测定标本空白管吸光度。用测定管吸光度减去标本空白管吸光度后，再计算结果。

【结果计算】

$$\text{血清白蛋白 (g/L)} = \frac{\text{测定管吸光度}}{\text{标准管吸光度}} \times \text{白蛋白标准液浓度 (g/L)}$$

参考范围 35 ~ 55g/L。

【注意事项】

1. BCG 是一种 pH 指示剂，变色域为 pH3.8 (显黄色) ~ 5.4 (显蓝绿色)，受酸、

碱影响较大，故所用的器材必须无酸、碱污染，BCG 工作液的 pH 必须精确度监测，务必使其保持在 $\text{pH}4.15 \pm 0.05$ 限度内。

2. BCG 与球蛋白的反应强度与环境温度有关（温度升高，呈色加速加深）。BCG 工作液中的表面活性剂虽有延缓 BCG 与球蛋白的非特异性反应的作用，但亦将测定标本与标准液置于同一温度下操作，以抵消温度的干扰作用。

3. Brij-35 是非离子型表面活性剂，其浓度大小对结果测定有影响，浓度越大，吸光度越低，但显色稳定。Brij-35 也可用其他表面活性剂代替，如吐温-20 或吐温-80，终浓度为 2ml/L ，灵敏度和线性范围不变。

4. 实验证明，BCG 不但与白蛋白呈色，而且与血清中多种蛋白质成分呈色，其中以 α_1 -球蛋白、运铁蛋白、结合珠蛋白更为显著，其反应速度较白蛋白稍慢。由于在 30s 内呈色对白蛋白特异，故 BCG 与血清混合后，在 30s 读取吸光度，可明显减少非特异性呈色反应。为了减少本法基质效应的影响，最好用参考血清作标准。

【方法学评价】

1. 本法操作简便、快速，胆红素和一般脂血对测定无明显干扰。

2. 血红蛋白和 BCG 产生与白蛋白相等的颜色强度，血红蛋白在 1000mg/L 以下无明显干扰， 2000mg/L 使吸光度增高 3.2% ， 3000mg/L 使吸光度增高 7.4% ， 4000mg/L 使吸光度增高 7.7% ， 5000mg/L 使吸光度增高 8.8% ，所以溶血标本不宜做 BCG 法白蛋白测定。

3. 本法既可手工操作，也能自动化分析，是目前国内测定血清白蛋白最常用的方法。本法线性范围为 $10 \sim 60\text{g/L}$ ， $\text{RCV} \leq 4\%$ 。但该法与溴甲酚紫法比较，对血清白蛋白特异性稍差。

4. 血清白蛋白测定法主要有色氨酸含量法、染料结合法、电泳法、免疫化学法和电化学测定法。

【思考题】

1. 加入 Brij-35 非离子型表面活性剂的作用是什么？
2. 阐述 BCG 法测定血清白蛋白的原理和影响因素及条件控制。
3. BCG 与血清混合后，为什么要在 30s 读取吸光度？
4. 微量加样器怎样使用？

三、A/G 比值计算

用双缩脲法测定血清标本中总蛋白浓度，减去血清白蛋白浓度即为球蛋白浓度，并可求得血清白蛋白、球蛋白比值（A/G 比值）。

参考范围 $\text{A/G} > 1$ 。

（马洁）

实验三 糖类测定

临床上常见的糖代谢紊乱是指血糖浓度过高或过低，其中以糖尿病最为常见。糖尿病的检验指标主要包括空腹血糖或随机血糖、口服糖耐量试验、糖化血红蛋白测定等，在糖尿病的诊断、分型、疗效评估以及并发症的诊断和鉴别诊断上有重要意义。

一、血糖测定（葡萄糖氧化酶法）

【目的与要求】

掌握葡萄糖氧化酶法测定血糖的原理、方法学评价和临床意义；熟悉 Trinder 反应的初步应用。

【原理】

葡萄糖氧化酶（glucose oxidase, GOD）利用氧和水将葡萄糖氧化为葡萄糖酸，并释放过氧化氢。过氧化物酶（peroxidase, POD）在色原性氧受体存在时将过氧化氢分解为水和氧，并使色原性氧受体 4-氨基安替比林和酚去氢缩合为红色醌类化合物，即 Trinder 反应。红色醌类化合物的生成量与葡萄糖含量成正比。

【试剂】

1. 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液（pH7.0） 称取无水磷酸氢二钠 8.67g 及无水磷酸二氢钾 5.3g 溶于蒸馏水 800ml 中，用 1mol/L 氢氧化钠或 1mol/L 盐酸调 pH 至 7.0，用蒸馏水定容至 1L。
2. 酶试剂 称取过氧化物酶 1200U，葡萄糖氧化酶 1200U，4-氨基安替比林 10mg，叠氮钠 100mg，溶于磷酸盐缓冲液 80ml 中，用 1mol/L NaOH 调 pH 至 7.0，用磷酸盐缓冲液定容至 100ml，置 4℃保存，可稳定 3 个月。
3. 酚溶液 称取重蒸馏酚 100mg 溶于蒸馏水 100ml 中，用棕色瓶贮存。
4. 酶酚混合试剂 酶试剂及酚溶液等量混合，4℃可以存放 1 个月。
5. 12mmol/L 苯甲酸溶液 溶解苯甲酸 1.4g 于蒸馏水约 800ml 中，加热助溶，冷却后加蒸馏水定容至 1L。
6. 100mmol/L 葡萄糖标准贮存液 称取已干燥恒重的无水葡萄糖 1.802g，溶于 12mmol/L 苯甲酸溶液约 70ml 中，以 12mmol/L 苯甲酸溶液定容至 100ml。2h 以后方可使用。
7. 5mmol/L 葡萄糖标准应用液 吸取葡萄糖标准贮存液 5.0ml 放于 100ml 容量瓶