

临床生化. 血清检验法



临床生化、血清檢驗法

上海市立医学化驗所 編

上海科学技术出版社

內 容 提 要

上海市立医学化驗所，历年來积累了不少临床檢驗經驗，在工作中所用的化驗操作，大部分已成为通用的常規。此書原来編写給初級檢驗人員訓練班作为实习用的范本。內容包括生化檢驗，血清檢驗，共九十余种方法，都是日常应用的技术；現經一度修改，不但訓練初学者可作为参考教材，就是經常从事檢驗工作者，也不妨备作临床上的参考。

临床生化、血清檢驗法

上海市立医学化驗所 編

上海科学出版社出版

(上海瑞金二路493号)

上海市书刊出版业营业登记证出 0931

新华书店上海发行所发行 各地新华书店經售

上海新华印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 5 24/32 字数 148,000

(1959年2月第1版印15,000册)

1961年6月第2版 1963年12月第2次印刷

印数 3,501—7,500

統一書号：14119·581

定 价：(十二) 0.82 元

再版說明

本书原名《临床生化、血清檢驗常規》，出版已逾二年，承蒙讀者热忱关怀，供給許多宝貴意見，使我們这一次再版的内容比較充实，不胜感激。

这次主要是修改前版的缺点，增加一些新的内容，例如：改良血清鉄及鉄結合力測定、血清銅測定、血清鈉微量測定、血清蛋白及血清脂蛋白紙上电泳法；同时又补充某些操作原理和操作注意点，并改变了某些編次。

“操作注意点”部分是輯录各家发表的原文，部分由我所工作同志归納几年来积累的經驗。其中有些資料經上海第一医学院附属第一医院檢驗科主任倪贊明同志校閱和指正，特此志謝。

在編写及增修过程中，既限于時間，又限于水平，难免存在着不少缺点，仍希临床生化界同志們，多多提出批評，帮助下次再改版时修正。

上海市立医学化驗所

1961, 4, 20

目 录

一、比色法	1
二、分析天平的使用和称量規則	12
三、溶液濃度的单位与配制	13
四、血液化学	27
1. 无蛋白血滤液的制备	27
2. 葡萄糖之測定	30
3. 非蛋白氮(简称 N.P.N.) 之測定	32
4. 尿素氮之測定	34
(甲)卡尔氏法(34) (乙)福林、吳氏改良法(36)	
5. 肌酐之測定	38
6. 肌酸之測定	39
7. 尿酸之測定	40
8. 氯化物之測定	42
(甲)鉍酸鉀作指示剂法(42) (乙)华脫霍氏法(42)	
9. 无机磷之測定	45
10. 鈣之測定	47
(甲)克拉克氏与柯立柏氏法(47) (乙)血鈣微量快速直接滴定法(49)	
11. 鉀之測定	51
12. 鈉之測定	53
(甲)克萊茂氏和吉脫門氏法(53) (乙)血清鈉微量測定法(55)	
13. 淀粉酶之測定	57
14. 脂肪酶之測定	59
15. 碱性磷酸酶之測定	60
16. 酸性磷酸酶之測定	62
17. 二氧化碳結合量之測定	63
18. 抗坏血酸之測定	67
19. 丙酮酸試驗	70
20. 黄疸指数測定	71

21. 血清胆紅素測定.....	72
(甲)樊登白氏法(72) (乙)总胆紅素測定(74) (丙)一分鐘胆紅素測定(75)	
22. 腦磷脂胆固醇絮狀試驗.....	76
23. 麝香草酚浊度試驗 (簡称 T.T.T.)	77
24. 麝香草酚絮狀試驗 (簡称 T.F.T.)	79
25. 硫酸鋅浊度試驗.....	79
26. 血清鉄之測定.....	80
(甲)华格与巴根氏法(80) (乙)改良血清鉄測定(Ramsay 氏法)(81)	
(丙)鉄結合力測定(82)	
27. 血清銅測定.....	83
28. 血清轉氨酶測定.....	85
29. 血清酚四溴联苯鈉(B.S.P.)測定	89
30. 高田-荒二氏試驗	90
31. 蛋白質总量,白蛋白及球蛋白之測定	90
(甲)凱氏微量法(90) (乙)格林勃氏法(92) (丙)双縮脲改良法(94)	
32. 蛋白質紙上电泳測定.....	95
(甲)血清蛋白紙上电泳法(95) (乙)血清脂蛋白紙上电泳法(96)	
33. 纖維蛋白元之測定.....	97
34. 胆固醇之測定.....	98
35. 胆固醇酯之測定.....	100
五、尿液化学	102
1. 蛋白定性測定.....	102
2. 蛋白定量測定.....	102
3. 葡萄糖定性測定.....	102
4. 葡萄糖定量測定.....	104
5. 醋酮定性測定.....	104
6. 双醋酸定性測定.....	105
7. 乙羧酸定性測定.....	105
8. 尿胆色素之測定.....	106
9. 尿胆元之測定.....	106
10. 尿胆素之測定.....	107
11. 尿藍母之測定.....	107

12. 重氮反应試驗·····	108
13. 隱血之測定·····	108
14. 淀粉酶之測定·····	109
15. 尿素氮之測定·····	109
16. 尿液氮定量測定·····	110
17. 肌酐之測定·····	111
18. 肌酸之測定·····	112
19. 尿酸之測定·····	113
20. 尿鈉之測定·····	114
21. 尿鈣之測定·····	114
22. 无机磷之測定·····	115
23. 尿液內氯化物之測定·····	116
24. 馬尿酸之測定(甲)(乙)·····	117
25. 酚紅排泄試驗(P.S.P.)·····	119
26. 17 酮类固醇之測定(甲)(乙)·····	120
27. 尿素廓清試驗·····	124
六、糞便化学·····	127
1. 胆色素之測定·····	127
2. 隱血之測定·····	127
3. 粪胆元定量測定·····	127
4. 脂肪之測定·····	128
5. 糞便氮測定·····	129
七、脑脊髓液化学·····	130
1. 蛋白定性測定·····	130
(甲) 罗乔二氏試驗·····	130
(乙) 潘氏試驗·····	130
(丙) 隆阿二氏試驗·····	130
(丁) 李文生氏試驗·····	130
(戊) 色氨基酸試驗·····	131
2. 蛋白定量測定·····	131
(甲) 三氯代醋酸沉淀法·····	131
(乙) 硫柳酸沉淀法·····	132
3. 葡萄糖之測定·····	132

4. 氯化物之測定	132
5. 胶体金之測定	132
八、胃液及十二指腸液化学	134
1. 酸度測定	134
(甲) 游离酸測定	134
(乙) 总酸度測定	134
2. 乳酸測定	135
3. 隱血測定	135
4. 胆汁測定	135
5. 胰蛋白酶之測定	135
九、康氏試驗	137
1. 血清試驗	137
2. 脊髓液試驗	139
3. 康氏抗原制造	139
十、华氏試驗	142
1. 华氏反应定量試驗总則	142
2. 試驗前之准备	142
3. 試驗方法	152
4. 結果及报告	160
十一、肥达氏試驗	161
十二、波浪热試驗	162
十三、嗜异性血球凝集試驗	163
1. 初步試驗	163
2. 豚鼠肾脏悬液吸收試驗	163
3. 牛紅血球吸收試驗	164
十四、診斷原发性非典型性肺炎之血球冷凝集試驗	166
附 录	
(一) 鈉量滴定換算表	167
(二) 比色計算表	168
(三) 金斯勃蛋白比色管制备法	174
(四) 达脫氏溶血素制备法	174
(五) 杜波斯(Du Bois)氏人体面积計算图	175

一、比 色 法

(一) 比色法的原理

1. 比色法的意义

重量分析法或容量分析法往往不能测定极微量的物质，而比色法则能胜任。所以比色法是生物化学中最常用的一种定量测定方法。此外，比色法操作过程亦较简便。

当用比色法测定试样中某种化学成分时，可于试样中加入某种适宜的试剂，使其产生有色化合物，其颜色的深浅与试样中该化学成分的含量成正比。将未知有色溶液与已知含量的有色标准溶液相比，即可求得此未知溶液的正确含量。

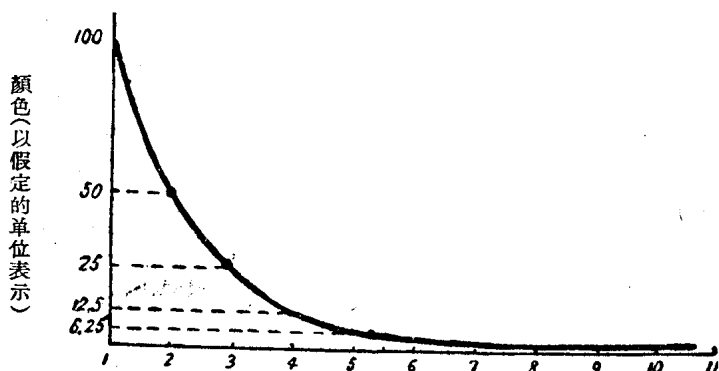
2. 郎貝特-貝尔(Lambert-Beer)氏定律

当一束单色光线通过某一物质时，这光线必被这物质吸收一部分。每一物质吸收光线的量是不同的，而且对于光谱的各色光的吸收率也是不同的，所以每一物质各有其本身的消光系数或吸收系数。同一物质，在同一波长的照射线下和同一温度时，其消光系数是个常数。

当一束单色光线照射某一物质的溶液时，其透过光的强度除与上述的因素有关之外，和液层厚度及溶液浓度也有关系。郎貝特-貝尔氏定律就是阐明此中关系的定律。

根据这定律，光被溶液吸收的量随溶质的浓度或其液层厚度的增加而增加，但两者的改变并不成正比，而是按指数函数的关系改变。为了阐明这种关系，假设被测定的显色物质的溶液分为许多等厚的薄层，例如每层厚度 1 厘米，并假定光照射强度为 100 单位，这物质每一单位液层的吸收光量是入射光的一半；这时第

一液层由 100 个单位中吸收 50 个单位，余剩的 50 个单位在第二层又丢失一半，而在第三层则射入的只有 25 个单位，经过第三层又有 12.5 个单位被吸收，故其余各层都可依此类推。这种情况可以由曲线表现如下：



l - 吸光层的厚度

图 1 光被溶液吸收的情况

为了应用方便，一般用 I_0 代表入射光的强度； I 代表透过光的强度； l 代表被测定物质的液层厚度。

c 代表被测定物质的浓度； k 代表该物质的吸光常数。

故郎贝特-贝尔氏定律所阐明的递减指数函数的关系可写成公式如下：

$$I = I_0 \times 10^{-k \cdot c \cdot l} \quad (1)$$

亦即

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-k \cdot c \cdot l} \quad (2)$$

亦即

$$\log \frac{I}{I_0} = -k \cdot c \cdot l \quad (3)$$

I/I_0 称为透光度，可以 T 表示之。通常用其百分率，称为透光率，即 $T \times 100 = T\%$ 。

由(3)式诱导出下式，则可去其负号：

$$\log \frac{I_0}{I} = k \cdot c \cdot l \quad (4)$$

$\log \frac{I_0}{I}$ 称为消光度或光密度,以 E 或 O. D. 表示之; 即 $E = \log \frac{I_0}{I}$ 。由于 E 和

k. c. l. 成直线正比,所以计算较为方便。

$$E = \log \frac{I_0}{I} = -\log T = 2 - \log(T\%) = k.c.l.$$

【注】 log 即对数值。

由上式可以看出: (1) 式光密度与溶液浓度、液层厚度成正比,而透光度的对数值与溶液浓度、液层厚度成正比。这便是比色定量法的理论基础。

(二) 比色计的种类

比色计可区分为视式比色计与光电比色计两大类。

1. 视式比色计

依靠肉眼比较未知溶液及标准溶液颜色深度的比色计称为视式比色计。

视式比色计更可分为:

(1) 固定比色计: 用方木块凿孔而成, 孔中可插入标准管与未知管。试验前, 须先行配制一系列不同浓度之标准管, 逐个与未知管进行互相比色或比浊, 以求得其含量。此种比色计虽准确度较差, 但使用简便, 常用于尿液的化学分析, 如测定尿蛋白含量等。

(2) 稀释比色计: 此种比色计仅有一个标准管, 比色时将其未知管逐渐稀释, 使其色泽与标准相同, 然后求得未知液浓度。此种比色计应用不广。例如沙利氏血色蛋白测定法。

(3) 杜勃斯克(Duboscq)氏型比色计:

如图 2,3 所示, 比色计的下端有一反光镜, 镜的上方有可取下的玻杯两只, 分别盛标准液及未知液; 并可上下移动, 调节距离。两杯的上端各有玻柱, 当光线由反光镜从玻杯下端射入液层后, 即经过玻柱而转入三棱镜。

三棱鏡有折光作用,使来自两玻柱之光綫集中一軸,出現于一个視野,而用接目鏡观察之。視野左半光綫来自右杯,右半光綫来自左杯。比色計的两旁各有螺旋,可調节两杯的距离,由其刻度(每格=1毫米),可讀出各杯的厚度(即自玻柱底面至玻杯底間的距離)。目前一般在底部尚装有电灯,可代替反光鏡供作光源。

(1) 先将反光鏡或灯光对光,使接目鏡內所見左右两半圓形視野的亮度一致。

(2) 将两玻杯慢慢向上轉动,使杯底与玻柱底相接触,从上端玻框向下观察二边的刻度是否都在零度,否則即用此比色計两边的調节器,将刻度尺調整至零度,此时即表示玻柱底面与杯底間的距離为零。

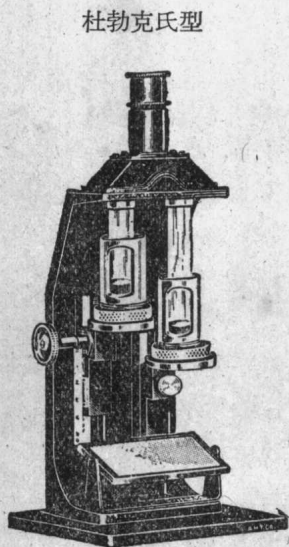


图2 国产比色計

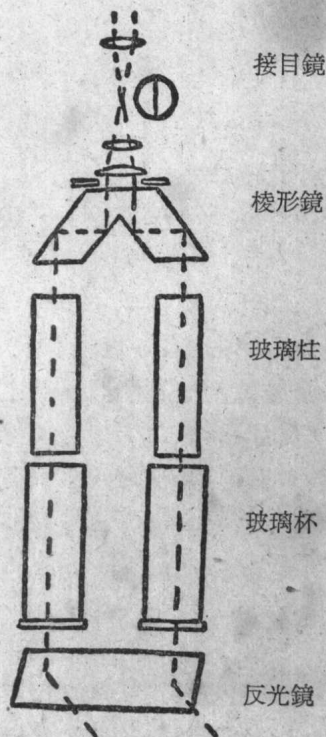


图3 比色計构造图

(3) 將玻杯降下取出，于左杯內盛标准液后，再慢慢向上轉动，使固定于 20 毫米处。

(4) 于右杯內盛未知液，亦慢慢上轉，同时察看目鏡，直至左右两半視野的顏色深度完全相同为止。

(5) 再从上端玻框向下察看二旁所指示的刻度，此即为两杯溶液的厚度。若未知液之厚度讀数小于 15 毫米或大于 25 毫米，可适度稀釋未知液或标准液，使讀数能在 15~25 毫米範圍內。

(6) 記錄讀数并計算未知液之濃度。

原理 同一物質的呈色溶液，其顏色深度若相等，則其光密度即相等。在視式比色計中，是調节液层的厚度，使两种不同濃度的溶液得到同等的光密度，然后由其厚度的差异，以求其濃度。若以公式表示之，即：

$$E_1 = k \cdot c_1 \cdot l_1 \qquad E_2 = k \cdot c_2 \cdot l_2$$

因

$$E_1 = E_2$$

所以

$$k \cdot c_1 \cdot l_1 = k \cdot c_2 \cdot l_2$$

即

$$c_1 \cdot l_1 = c_2 \cdot l_2$$

或

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{l_2}{l_1}$$

即此时濃度与厚度成反比。

若

c_1 = 未知溶液濃度

c_2 = 标准溶液濃度

l_1 = 未知溶液厚度

l_2 = 标准溶液厚度

則

$$\frac{\text{未知溶液濃度}}{\text{标准溶液濃度}} = \frac{\text{标准溶液厚度}}{\text{未知溶液厚度}}$$

故可按下式求得未知溶液濃度

$$\text{未知溶液濃度} = \frac{\text{标准溶液厚度}}{\text{未知溶液厚度}} \times \text{标准溶液濃度}$$

此乃視式比色計运算公式。

計算法 上式仅求得測定液之濃度，如欲求得每 100 毫升測样內物質之总量，則更应将測定时測样用量及标准液与測定液之

容量等因素計算在內。茲举例說明如下：

例如欲測定血液內非蛋白氮之含量，若所用之標準液內氮含量為 0.15 毫克，稀釋於 50 毫升試劑內；則測定時所用之測樣為血液 0.5 毫升（即 1 比 10 稀釋之無蛋白血濾液 5 毫升），亦當稀釋於 50 毫升之試劑內。如于比色時，二半圓視野內色澤相同，標準液杯在 20 毫米處，而測定液杯在 24 毫米處，則 100 毫升血液內非蛋白氮含量之毫克數可依下式求得之：

$$\frac{\text{標準液厚度(毫米)}}{\text{測定液厚度(毫米)}} \times \text{標準液濃度(毫克)} \times \frac{\text{測定液總量(毫升)}}{\text{標準液總量(毫升)}} \times \frac{100 \text{ (毫升)}}{\text{測定時實際應用標本量(毫升)}} = \text{每百毫升標本內所含測定物之毫克數}$$

$$\text{即} \quad \frac{20}{24} \times 0.15 \times \frac{50}{50} \times \frac{100}{0.5} = \frac{20}{24} \times 30 = \frac{600}{24} = 25$$

即 每百毫升血液標本內含有非蛋白氮 25 毫克。

操作注意點

(1) 光綫透過杯中溶液時，為帶色物質吸收，所吸收之光度與溶液之色度成正比。但應用此法檢定溶液濃度與實際數值常有偏差；為減少誤差計，要使未知溶液與標準液之色度愈近似愈好。標準液如放在 20 毫米處，未知溶液的讀數應以不超過 28 或 14 為宜。

(2) 標準液與未知溶液之濃度須適宜。太濃則吸光量多，液柱要短才能讀取，故微有移動影響讀數很大。太稀則調節液柱對色度變動的影響極小。

(3) 由接目鏡觀察時，宜分作數次窺望，不可凝視太久，以免目光疲倦而致比色不准。

(4) 溶液裝杯時不要太多，以免外溢而損及反光鏡，亦不可太少以致太淺，不能與玻璃柱接觸。

(5) 測驗完畢，傾出溶液，用蒸溜水洗杯，再盛蒸溜水于杯內，洗滌玻璃柱。洗滌時，將玻璃杯上下移動，切勿左右搖擺，以免損壞玻璃柱；洗滌後，用棉紙拭干玻璃杯，並將玻璃杯倒置于潔淨布巾上。

(6) 欲試驗比色計是否精確，可將同樣色度之溶液分別置于二杯內，將左杯固定於 20 毫米處，再移動右杯，至二半圓視野內色澤完全一致為度，此時右杯亦應位於 20 毫米刻度處，方為準確。如二杯皆位於 20 毫米刻度處，而二半圓視野內色度並非完全一致，可調整反光鏡或燈光以校正之。

(7) 接目鏡與玻璃柱等，非必要時，切勿卸下，以免塵埃染污。比色計不用時，應置於箱內，或罩於玻罩或布罩內，避免直接光線之照射。

2. 光电比色計

原理 光电比色計的液柱厚度是固定的，但利用光电裝置可直接測定光密度或透光度，使透過的光經過光電池或光電管而轉變為電流，再用電流計測定電流的大小；電流的大小與透過光的強度成正比，而透過光的強度又與溶液濃度有關，因此可以間接地測定溶液的濃度。

構造 光电比色計的構造有各種形式，但任何光电比色計都包括：光源和聚光鏡、濾光板、比色槽、光電管或光電池、電流計五個主要部分。

(1) 光源和聚光鏡：光源的強度要求保持不變。為了使通過溶液的光線變為平行光線，光电比色計都附有聚光透鏡。

(2) 濾光板：貝爾氏定律僅適用於單色光線，一般溶液僅吸收光譜中很狹窄的一部分光帶，其他波長的光線則吸收很少。若用濾光板，則可除去這些被吸收很少的光波而增加測量的準確度。

測定時應選擇何種色澤的濾光板，則隨測樣溶液的色澤而異，按一般原則濾光板的顏色應該是溶液顏色的互補色。例如紅色濾光板適用於綠、藍、青紫等色澤的測樣溶液；綠色濾光板適用於紫、青紫等色澤的測樣溶液；藍色濾光板適用於紅、橙黃等色澤的測樣溶液。有些文獻上不說明顏色，而用波長若干毫微米($m\mu$)表示，其意義亦正相同。光譜中光線波長 400~500 毫微米之光源呈藍色，500~600 毫微米呈綠色，600~700 毫微米現紅色。

此种滤光板平时应妥善保藏，避免长期受日光照射或受潮生霉，致影响其原有之色澤。

茲以图解說明滤光板之作用如下：

1) 光綫通过盛蒸馏水之試管后，几乎全部光綫透过而达于光电池上，此时电流計所指之透光度为 100%。

2) 光綫通过有色澤之測定液时，仅有一小部分特殊波长之光綫被此种色液所吸收（图中以虛綫表示之）；大部分之光綫仍通过色液而达于光电池，故此时电流計上所指之透光度仍达 90%（即仅 10% 光綫被吸收）。

3) 加上一特殊色澤之滤光板，此种滤光板可滤除不能被此种測定液內有色溶液所吸收之光波，仅令可被測定液所吸收之光波通过。再行調整光源

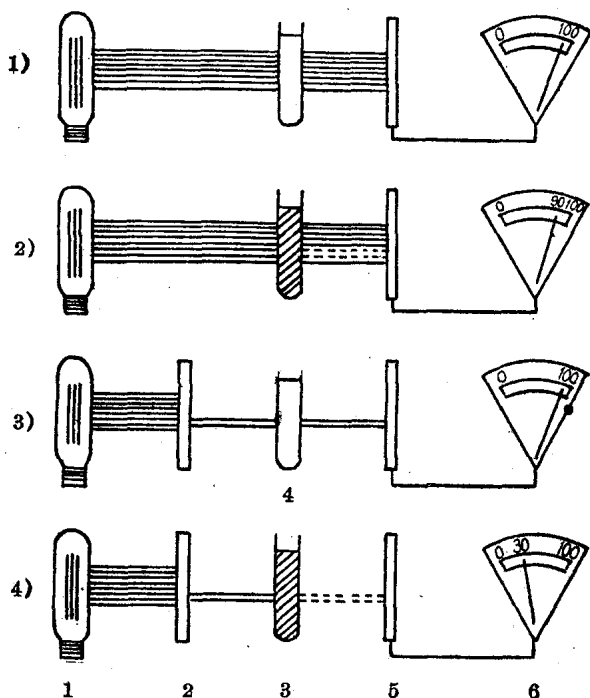


图 4 光度計(光电比色計)內滤光板可滤除一部分不需要之光綫，以增加測定时之敏感性。

1. 光源(普通灯光)； 2. 滤光板； 3. 盛有色澤溶液之測定管；
4. 盛有蒸馏水之空白对照管； 5. 光电池； 6. 电流計。

之强度,使其通过蒸馏水空白对照管时,其透光度仍为 100%。

4) 将蒸馏水空白对照管换以有色溶液之测定管,此时电流计所指之透光度已减为 30% (即 70% 光线被吸收)。此因不能被测样内有色溶液所吸收之光线皆已被滤光板滤除,故透光度显著减少,测定之敏感度乃因而增加。

(3) 比色槽: 即放置测液的容器,有长方形的,有试管形的,若使用两个比色槽,则它们的大小厚度必须相同。

(4) 光电管或光电池:

1) 光电管是一个两极真空管,其阴极为一金属片,上涂一层化学物质(如氧化铯),此种物质经光照射后可放出电子。当光电管两极与一电池相连时,这些电子由阴极到了阳极,就有电流在电路中通过,通常这个电流是很小的,需用一套电子管放大装置将其放大,始可由电流计中读出。

2) 光电池与光电管的构造完全不同,例如常用的硒光电池是由三层物质组成的圆形或长方形薄片。薄片上面的第一层是用导电优良的金属(如金、铂等)做成的透光金属膜,这是光电池的负极;中层是半导体物质硒;第三层是铁片,这是光电池的正极。受光照射后,半导体的表面逸出电子,这些电子只向负极方向移动,而不向其他方向移动,因此在上下两金属之间产生一个电位差,线路连接时即产生电流。光电池产生的电流可不必经过放大,即可用灵敏的电流计测量。

与光电管相比较,光电池更耐用,所产生的电流也较大。光电池有时显“疲劳效应”,为其缺点;即经强光照射后,光电流很快升至一较高数值,然后逐渐下降。照明强度愈大,“疲劳效应”亦愈显著。故在使用时应注意,若无滤光板在内,不要开亮灯泡,以免强光照射光电池。若光电池显“疲劳效应”时,可将其放置黑暗处,使其恢复原有的灵敏度。

(5) 电流计: 电流计上面的刻度刻着透光度与光密度。若仅有透光度%,则可以按 $\text{光密度} = 2 - \log \text{透光度}\%$ 计算其光密度。

【注】 $\text{光密度} = \log \frac{I_0}{I} = \log I_0 - \log I$

若以 I_0 作 100 计算,则 $\log I_0 - \log I = 2 - \log \text{透光度}\%$