

血液疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.000317

人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡的研制

王 徐,刘剑波,刘明博,赵敏珠,张 鹏,朱 英,李剑波

(重庆医科大学基础医学院法医学教研室,重庆 400016)

【摘要】目的:明确亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效关系,研制人血高铁血红蛋白浓度检测卡,为法医检案、侦查及临床医务工作者提供一种快速、安全且经济的检测方法。**方法:**建立亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效方程,获取制备 10%~80%(间隔 10%)高铁血红蛋白血样所需的亚硝酸钠溶液浓度。将健康人与 10%~80%高铁血红蛋白血样分别滴于血样采集卡,扫描获取红绿蓝(red,green,blue,RGB)值,生成色块后,制成检测卡。**结果:**不同浓度的亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率呈直线正相关。随着高铁血红蛋白血样浓度增高,其颜色在血样采集卡上逐渐变深。**结论:**该检测卡为人血高铁血红蛋白的检测提供了快速、安全且经济的方法,值得推广。

【关键词】高铁血红蛋白;快速;红绿蓝值;检测卡;法医学

【中图分类号】R89

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-05-15

Invention of a rapid detection card for blood methemoglobin concentration in human

Wang Xu, Liu Jianbo, Liu Mingbo, Zhao Minzhu, Zhang Peng, Zhu Ying, Li Jianbo

(Teaching and Research Section of Forensic Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the relation between nitrite solutions with different concentrations and methemoglobin formation rates, to invent a rapid, safe and economical detection card for blood methemoglobin concentration in human and to provide references for forensic science and clinical work. **Methods:** According to the dose-effect equation between nitrite solutions with different concentrations and methemoglobin formation rate, nitrite solutions with different concentrations were obtained for generating methemoglobin blood samples with different concentrations (10%~80%). Then, blood samples from healthy donors and methemoglobin blood samples with different concentrations were dropped on the blood collection cards. The values of red, green, blue (RGB) were acquired, and different methemoglobin color-pieces were generated. Finally, the rapid detection card was successfully fabricated. **Results:** Nitrite solution with different concentrations and methemoglobin formation rates was in linear correlation. With the increasing of concentration of methemoglobin in the blood sample, the color of the detection card became more and more dark. **Conclusion:** This detection card is rapid, safe and economical for methemoglobin concentration detection. Therefore, it might be widely applied in the future.

【Key words】 methemoglobin; rapid; red, green, blue (RGB); detection card; forensic science

高铁血红蛋白生成受多种因素影响,遗传因素、服用某些毒(药)物等均可导致其在血液中浓度增加^[1-3],当其含量超过血红蛋白总量 1%时即引起高铁血红蛋白血症,导致机体功能性贫血、血红蛋白氧合障碍,严重时引起死亡^[4-5]。

在法医日常检案中,亚硝酸钠中毒者多以误食或者利用亚硝酸钠自(他)杀所致获得性高铁血

蛋白血症最为常见。亚硝酸钠外观似食盐,易误食,人体中毒剂量约为 0.3~0.5 g,致死量约为 3 g^[6]。因此对于怀疑亚硝酸钠中毒者,应当立即对其体液、组织,残留食物等进行检测。但因亚硝酸钠吸收入血快、且分解消退亦迅速^[6],故快速检测血液高铁血红蛋白含量变得尤为重要。

本研究利用亚硝酸钠能将 Fe^{2+} 血红蛋白氧化成 Fe^{3+} 高铁血红蛋白这一原理,将亚硝酸钠溶液作用于全血样本,生成高铁血红蛋白,建立亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效方程。利用高铁血红蛋白浓度影响血液颜色变化这一物理特性,采用

作者简介:王 徐,Email:120703038@qq.com,

研究方向:法医病理学。

通信作者:李剑波,Email:ljb2032008@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150415.2223.003.html>

(2014-05-23)

红绿蓝(red, green, blue, RGB)色彩模式,首次研制一种基于比色卡原理技术的人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡。该检测卡的研制为法医中毒案件的快速分析、现场的及时侦查以及为临床医务工作者检测血液中铁血红蛋白浓度,提供了一种快速、安全且经济的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料来源与纳入标准 健康成人志愿者纳入标准:参照《关于进一步做好公务员考试录用体检工作的通知》(渝人社发[2013]7号),血样均来自健康成人志愿者(无疾病、血红蛋白含量、血氧饱和度等均在正常范围),共32例,男16例、女16例;每人采静脉血各20 ml(分装2管,每管10 ml),肝素抗凝,4℃保存。

1.1.2 主要仪器与试剂 单光束紫外可见分光光度计 UV-7504(上海欣茂);石英比色皿(上海欣茂);LiDE 110 扫描仪(Canon 佳能);RGB Color Finder 软件(Adobe 公司);亚硝酸钠(上海生工);高铁血红蛋白试剂盒(南京建成);血样采集卡(四川瑞生科技有限公司)等。

1.1.3 试剂配制 (1)高铁血红蛋白测定应用液:将高铁血红蛋白测定浓缩液与蒸馏水以1:9的体积比进行混合,4℃保存。(2)亚硝酸钠溶液(用于建立亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效关系方程):配制10~110 mmol/L(间隔10 mmol/L)的亚硝酸钠溶液,密封避光保存。(3)亚硝酸钠溶液[用于生成浓度百分比为10%~80%(间隔10%)高铁血红蛋白血样]:根据亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效关系方程,配制浓度百分比为10%~80%(间隔10%)高铁血红蛋白血样所需的亚硝酸钠溶液,密封避光保存。

1.2 方法

1.2.1 亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效关系方程建立 (1)血样孵育:每例($n=32$)健康成人志愿者取血样0.5 ml/管,共11管,肝素抗凝,分别注入0.1 ml浓度为10~110 mmol/L(间隔10 mmol/L)亚硝酸钠溶液,混匀,37℃水浴,孵育30 min^[7]。(2)高铁血红蛋白浓度百分比计算:血样孵育完全后,按照高铁血红蛋白试剂盒说明书,分光光度计1 cm光径,蒸馏水调零,分别测定630 nm处及602 nm处吸光度值,并计算血样中高铁血红蛋白浓度含量百分比。参照试剂盒中计算公式:高铁血红蛋白浓度百分比(%)= $[(A_{630\text{ nm}} - r \times A_{602\text{ nm}}) / (A_{602\text{ nm}} \times (R - r))] \times 100\%$,其中 $R=1.81$, $r=0.14$ 。(3)绘制量效方程:绘制亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效方程。

1.2.2 获取浓度百分比为10%~80%(间隔10%)高铁血红蛋白血样 每例($n=32$)健康成人志愿者取血样0.5 ml/管,共11管,肝素抗凝。根据前一步所得量效方程,每管分别注入0.1 ml浓度为11、25、39、53、67、81、95、109 mmol/L的亚硝酸

钠溶液,混匀,37℃水浴,孵育30 min^[7],获得浓度百分比为10%~80%高铁血红蛋白血样。

1.2.3 扫描未经孵育血样及孵育后浓度百分比10%~80%高铁血红蛋白 RGB 的值 取未经孵育血样及孵育后浓度百分比为10%~80%高铁血红蛋白血样,各取0.1 ml,滴于血样采集卡上,晾干后扫描采集卡获取图片,运用RGB Color Finder软件测量图片RGB值。并计算各组血样RGB算术平均值。

1.2.4 人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡的制作 将未经孵育血样及孵育后浓度百分比为10%~80%高铁血红蛋白血样的R、G、B算术平均值,输入RGB Color Finder软件中,生成相应色块。

1.3 统计学方法

SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经正态及方差齐性检验后,采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 10%~110%亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的关系

将10%~110%亚硝酸钠溶液分别与健康成人志愿者血样孵育后,相应的高铁血红蛋白生成率为:(8.85 ± 1.03)%、(15.37 ± 0.75)%、(25.49 ± 0.76)%、(29.92 ± 1.04)%、(36.74 ± 1.66)%、(46.86 ± 1.80)%、(52.19 ± 0.77)%、(60.01 ± 1.29)%、(66.23 ± 1.71)%、(74.85 ± 1.59)%、(83.48 ± 1.47)%,各组间比较差异显著(P 值均 <0.01)。

2.2 亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效方程

根据2.1结果,人血高铁血红蛋白生成率(Y)与亚硝酸钠溶液浓度(X)呈直线正相关,量效方程为: $Y=2.125\ 98 + 0.712\ 3X$ ($R^2=0.998\ 2$, $P<0.01$),见图1。

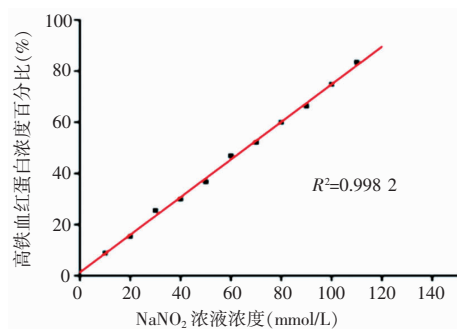


图1 亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间的量效方程

Fig.1 Dose-effect equation between sodium nitrite solutions with different concentrations and methemoglobin formation rate

2.3 未经孵育血样与孵育后浓度百分比为10%~80%高铁血红蛋白血样对比

由图2可看出,随着高铁血红蛋白浓度百分比的增高,血样采集卡上的颜色逐渐变深,最终呈棕褐色。

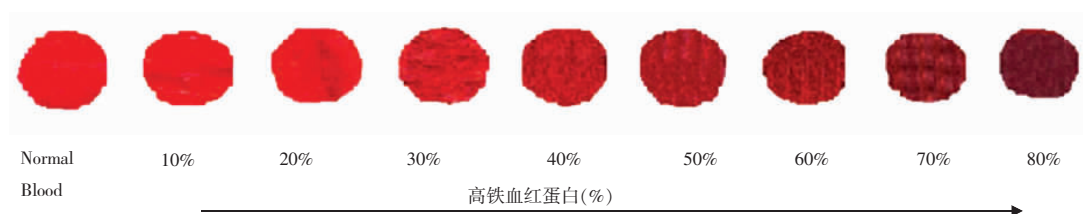


图 2 未经孵育血样与孵育后不同浓度的高铁血红蛋白血样肉眼观对照

Fig.2 Naked-eyed observation between normal blood sample and methemoglobin blood samples with different concentrations

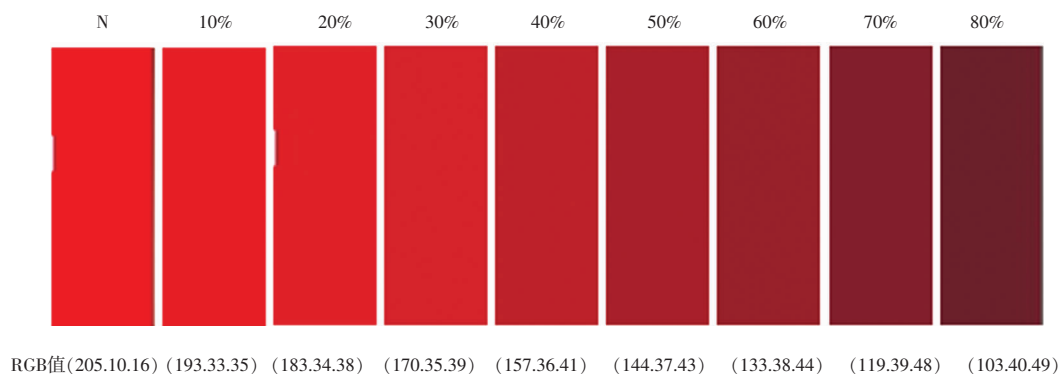


图 3 人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡

Fig.3 Rapid detection card for blood methemoglobin concentration in human

表 1 不同浓度的高铁血红蛋白血样的 RGB 值 ($\bar{x} \pm s, \%$)Tab.1 Comparison of RGB values in methemoglobin with different concentrations ($\bar{x} \pm s, \%$)

结果	<i>n</i>	10	20	30	40	50	60	70	80
R值	205.13 ± 3.12	193.16 ± 6.30	183.38 ± 5.25	170.25 ± 4.56	157.03 ± 3.23	144.25 ± 5.17	133.06 ± 3.82	119.13 ± 6.00	103.16 ± 5.21
G值	10.28 ± 2.19	33.37 ± 3.58	34.16 ± 4.50	35.25 ± 4.71	36.09 ± 4.06	37.28 ± 5.66	38.34 ± 2.72	39.03 ± 4.20	40.31 ± 3.42
B值	16.03 ± 4.09	35.03 ± 2.75	38.12 ± 3.22	39.05 ± 4.68	41.09 ± 4.59	43.00 ± 3.51	44.13 ± 3.55	48.16 ± 2.98	49.22 ± 3.52

2.4 人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡制作

经 RGB Color Finder 软件分析,得到未经孵育血样及孵育后浓度百分比为 10%~80% 高铁血红蛋白血样的 RGB 均值,取整数,并制成比色卡。见图 3、表 1。

3 讨论

目前,高铁血红蛋白含量测定方法主要有 3 种:氰化物法、计算分光光度法和等吸收气法。前者试剂较难于获得且保存时间短,实验中可产生挥发性剧毒 HCN 气体^[8];后两者受光密度值影响较大,结果准确度较低。除上述方法外,还有通过溶剂质子核磁共振弛豫率^[9]、高铁血红蛋白冷冻溶液中 Fe^{3+} 高度自旋形成零场分裂^[10]、拉曼光谱检测铁离子高自旋态和低自旋态特征峰强度^[11]及血气分析仪^[12]等,

但这些检测手段复杂,仪器昂贵,因此应用较少。一些国内外研究证实,尸体血液高铁血红蛋白形成后,消退迅速^[7];而把高铁血红蛋白血样置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,血样中高铁血红蛋白含量随保存时间延长却会有不同程度的升高^[13]。因此对怀疑有高铁血红蛋白血症的患者或死者,应即刻采样并进行分析。鉴于上述原因,有必要建立一种快速、安全且经济的人血高铁血红蛋白浓度检测方法。

研究证实,亚硝酸钠能将 Fe^{2+} 血红蛋白氧化成 Fe^{3+} 高铁血红蛋白^[14];将亚硝酸钠溶液体外作用于分离的红细胞,可将血红蛋白氧化为高铁血红蛋白^[15-16]。因此,本实验将亚硝酸钠溶液作用于全血样本,生成高铁血红蛋白。本实验显示亚硝酸钠溶液与高铁血红蛋白生成率间呈直线正相关。根据其量效方程,

可计算出当需形成浓度百分比为 10%~80%高铁血红蛋白血样时,分别所需的亚硝酸钠溶液浓度。

与正常血液相比,高铁血红蛋白血液呈现出棕褐色^[17]。本实验亦发现,随着高铁血红蛋白浓度的增加,血液颜色亦逐渐变深,呈棕褐色。故本实验采用高铁血红蛋白这一物理特性,制作出一种人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡。

RGB 色彩模式,该色彩模式可为图像中每一个像素 RGB 分量分配一个正整数的强度值(0~255)。这 3 种颜色按照不同比例混合,可在屏幕上呈现 16 777 216 种颜色,几乎包含了人类色觉所能感知的颜色,是目前运用最广的颜色系统之一^[18]。

本实验研制而成的人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡,可快速、安全且经济的测定血液中高铁血红蛋白的浓度;该检测卡安全无毒,体积轻巧,适合于在任何情况进行检测,在国内尚属首次研发。法医或临床医护工作者只需对怀疑有高铁血红蛋白血症的患者或死者,经末梢采取微量的血液滴于血样采集卡上,即可与该检测卡进行对比分析和判断初步得到其高铁血红蛋白浓度。该检测卡操作简单,有助于了解和判断患者或死者高铁血红蛋白的浓度及病情严重程度。不管是对于法医还是临床医务工作者,都有着重要的价值,且该检测法易掌握,值得推广和应用。目前,该人血高铁血红蛋白浓度快速检测卡在中毒案件的侦查、法医实践中的初步应用得到较好印证。

参 考 文 献

- [1] 郑德柱,兰风华,谢 飞,等.遗传性高铁血红蛋白血症分子诊断方法的研究[J].中华检验医学杂志,2004,27(7):415-419.
- [2] Skold A, Cosco DL, Klein R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management[J]. South Med J, 2011, 104(11): 757-761.
- [3] Ashurst J, Wasson M. Methemoglobinemia: a systematic review of the pathophysiology, detection, and treatment[J]. Del Med J, 2011, 83(7): 203-208.
- [4] Sachdeva R, Pageda JG, Casale LR, et al. Benzocaine-induced methemoglobinemia: a potentially fatal complication of transesophageal echocardiography[J]. Tex Heart Inst J, 2003, 30(4): 308-310.
- [5] Turner MD, Karlis V, Glickman RS. The recognition, physiology, and treatment of medication-induced methemoglobinemia: a case report[J]. Anesth Prog, 2007, 54(3): 115-117.
- [6] 刘 良, 张国华. 法医毒理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 147.
- [7] 许栋应, 李建云, 殷斌志, 等. 亚硝酸钠作用于红细胞形成高铁血红蛋白的条件研究[J]. 环境与健康杂志, 1999, 16(5): 269-271.
- [8] 阙雪梅, 尤国兴, 赵 莲, 等. 高铁血红蛋白含量测定方法研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(4): 385-388.
- [9] Aime S, Dastrú W, Fasano M, et al. Quantitative determination of methemoglobin by measuring the solvent-water proton-nuclear magnetic resonance relaxation rate[J]. Clin Chem, 1992, 38(12): 2401-2404.
- [10] Alpert Y, Couder Y, Tuchendler J, et al. Determination of the zero-field splitting in human acid methemoglobin by millimeter and submillimeter ESR experiments[J]. Biochim Biophys Acta, 1973, 322(1): 34-37.
- [11] 沈高山, 谷怀民, 闫天秀, 等. 亚硝酸钠和氧合血红蛋白反应的拉曼光谱[J]. 中国激光, 2009, 35(9): 1432-1436.
- [12] Ali AA, Ali GS, Steinke JM, et al. Co-oximetry interference by hemoglobin-based blood substitutes[J]. Anesth Analg, 2001, 92(4): 863-869.
- [13] Shihana F, Dawson AH, Dissanayake DM. Method of stabilizing blood for the determination of methemoglobin[J]. J Clin Lab Anal, 2011, 25(5): 366-368.
- [14] Wright RO, Lewander WJ, Woolf AD. Methemoglobinemia: etiology, pharmacology, and clinical management[J]. Ann Emerg Med, 1999, 34(5): 646-656.
- [15] Owen CS. High gradient magnetic separation of erythrocytes[J]. Biophys J, 1978, 22(2): 171-178.
- [16] Stepuro I, Chaikovskaya N, Piletskaya T, et al. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin[J]. Pol J Pharmacol, 1993, 46(6): 601-607.
- [17] 徐加菊, 陈贻骥. 遗传性高铁血红蛋白血症的基础与临床进展[J]. 儿科药理学杂志, 2009, 15(2): 60-63.
- [18] Choodum A, Nic Daeid N. Rapid and semi-quantitative presumptive tests for opiate drugs[J]. Talanta, 2011, 86: 284-292.

(责任编辑: 关蕴良)